

Postverlagsort Berlin

UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY

JUN 24 '64

ARCHIV FÜR MIKROBIOLOGIE

BEGRÜNDET VON

J. BEHRENS F. BOAS A. RIPPEL

HERAUSGEGEBEN VON

C. B. VAN NIEL
PACIFIC GROVE

R. NILSSON
UPPSALA

E. G. PRINGSHEIM
GÖTTINGEN vorm. CAMBRIDGE

W. H. SCHOPFER
BERN

H. TAMIYA
TOKIO

UND DEN SCHRIFTFLEITERN

A. RIPPEL-BALDES
GÖTTINGEN

R. HARDER
GÖTTINGEN

25. BAND · 3. HEFT

MIT 33 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 25. OKTOBER 1956)



SPRINGER-VERLAG

BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

1956

Arch.
Mikrobiol.

Per.
QR 1
Ar 25

Archiv für Mikrobiologie

Zeitschrift für die Erforschung der pflanzlichen Mikroorganismen. Begründet 1930
von J. Behrens, F. Boas, A. Rippel. Berlin, Springer.

Das „Archiv für Mikrobiologie“ steht Originalarbeiten und Sammelreferaten aus dem Gesamtgebiet der pflanzlichen Mikroorganismen offen. Arbeiten, die nur praktischen Zwecken dienen, scheiden aus, während im übrigen alle wissenschaftlichen Fragen aus „reinen“ und „angewandten“ Gebieten berücksichtigt werden. Das „Archiv“ erscheint nach Maßgabe des eingehenden Materials. Der Preis des Bandes beträgt DM 96.—.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 30.— für eine Arbeit. Sammelreferate werden mit DM 40.— für den Druckbogen honoriert.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophotos u. ä. von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihren Arbeiten 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Manuskripte erbeten an:

Prof. Dr. C. B. van Niel, California/USA, Pacific Grove, Stanford University, Hopkins Marine Station,

Prof. Dr. R. Nilsson, Uppsala 7/Schweden, Kungl. Lantbrukshögskolan, Mikrobiologiska Institutionen,

Prof. Dr. E. G. Pringsheim, Göttingen, Untere Karspüle, Pflanzenphysiologisches Institut,

Prof. Dr. W. H. Schopfer, Bern/Schweiz, Botanisches Institut der Universität,

Prof. Dr. H. Tamiya, Tokio/Japan, 41, Mejiro-Machi 4th St., The Tokugawa Institute for Biological Research,

oder an die *Schriftleitung:*

Prof. Dr. A. Rippel-Baldes, Göttingen, Institut für Mikrobiologie, Goßlerstr. 16

Prof. Dr. R. Harder, Göttingen, Pflanzenphysiolog. Institut, Nikolausberger Weg 18

Springer-Verlag

Berlin · Göttingen · Heidelberg

25. Band

Inhaltsverzeichnis

3. Heft

Seite

FROMMER, W., Erfahrungen mit Streptomycceten-Dauerkulturen 219

VÁVRA, J., Ist der Photoreceptor eine unabhängige Organelle der Eugleniden? 223

BORTELS, H., Die Bedeutung einiger Spurenelemente für Cellvibrio- und Cytophaga-Arten. Mit 10 Textabbildungen 226

BOCK, G., Über den Einfluß verschiedener Stoffe auf die Aktivität von Antibiotica gegenüber Mycobakterien. Mit 13 Textabbildungen 246

JAGNOW, G., Untersuchungen über die Verbreitung von Streptomycceten in Naturböden. Mit 3 Textabbildungen 274

FRIEDRICH, H., Der Abbau von phenolischen Substanzen durch Aspergillus niger. Mit 4 Textabbildungen 297

UEBELMESSER, E.-R., Über einige neue Chytridineen aus Erdboden (Olpidium, Rhizophidium, Phlyctochytrium und Rhizophlyctis). Mit 7 Textabbildungen 307

(Aus dem Organisch-Chemischen Institut, Biochem. Abt.,
der Universität Göttingen)

Erfahrungen mit Streptomyceten-Dauerkulturen

Von

WERNER FROMMER

(Eingegangen am 21. Juni 1956)

Obwohl die Streptomyceten in den letzten Jahren besonders durch die Vielzahl der von ihnen gebildeten Antibiotica eine große industrielle Bedeutung gewonnen haben, findet man in der Literatur nur wenige, zerstreute Angaben über die Haltbarkeit von Streptomyceten-Dauerkulturen.

HAYNES, WICKERHAM u. HESSELTINE (1955) berichten über ihre Erfahrungen mit gefriergetrockneten Dauerkulturen. Alle Stämme mit guter Sporenbildung konnten mit Erfolg lyophilisiert werden und sind zum Teil nach beinahe 8 Jahren noch am Leben (HESSELTINE, persönliche Mitteilung). Allerdings war es in einigen Fällen schwierig, die Stämme zu der für die Gefriertrocknung notwendigen Sporenbildung zu bringen. Außerdem zeigte sich nach der Lyophilisierung meist sehr schlechte Sporenbildung. CARVAJAL (1953) fand nach achtjährigem Aufbewahren in lyophilisierter Form bei *Streptomyces griseus* noch dieselbe Streptomycin-Ausbeute.

Die bei den Pilzen oft mit guten Erfolgen angewandte Haltung in steriler Erde (siehe THOM u. RAPER 1945 und RAPER u. THOM 1949) beschreibt bei Streptomyceten JONES (1946): 9 Stämme hielten sich in steriler Erde 4½ Jahre lang, ohne sich zu verändern, während die in dieser Zeit auf verschiedenen Nährböden gewachsenen und öfters abgeimpften Parallelkulturen verschiedene Abweichungen von den Ausgangskulturen zeigten. Auch CARVAJAL (1953) berichtet von guten Ergebnissen mit einzelnen Streptomyceten-Erdkulturen. ERIKSON (1947) konnte eine Förderung der Sporenbildung nach Erdkultur beobachten.

Die rund 2300 *Streptomyces*-Stämme der Sammlung des Organisch-Chemischen Instituts der Universität Göttingen wurden zum größten Teil in den Jahren 1949—1952 isoliert. Von 1950 an legte man von jedem Stamm parallel zu den etwa vierteljährlich abgeimpften Schrägröhrchenkulturen eine Öl-Kultur an.

Nach einer von BUELL u. WESTON (1947) beschriebenen Methode: Gut bewachsene Kulturen auf nicht schräg gelegten Agarröhrchen (Glycerin-Glykokoll-Agar nach v. PLOTTO¹) werden mit sterilem Mineralöl übergossen. Durch diesen Luftabschluß wird die Stoffwechselaktivität der Organismen stark herabgesetzt und das Austrocknen des Agars verhindert.

Die ältesten Öl-Kulturen sind demnach 6, die jüngsten 4 Jahre alt. (Nur etwa 100 Kulturen sind jünger als 4 Jahre.) Bei einer in den letzten Monaten durchgeführten Serienuntersuchung zeigte sich, daß rund 5%

¹ 2 Vol.-% Glycerin; 0,25% Glykokoll; 0,1% NaCl; 0,1% K₂HPO₄; 0,01% MgSO₄ · 7 H₂O; 0,01% FeSO₄ · 7 H₂O; 0,01% CaCO₃; 2% Agar.

dieser 2300 Kulturen auf Glycerin-Glykokoll-Agar nicht mehr zum Anwachsen zu bringen waren. Dabei soll nach HARTSELL (1955) der Nährboden (in diesem Fall also Glycerin-Glykokoll-Agar), der zur Öl-Kultur verwendet wurde, die höchsten Anwachsziffern ergeben. Der prozentuale Anteil der abgestorbenen Kulturen ist bei den 1950 angelegten Öl-Röhrchen nicht höher als bei den 1952 angelegten. Der weitaus größte Teil der Stämme ist aber nach einer Kulturdauer von 4—6 Jahren noch am Leben. Allerdings zeigen die aus den Öl-Kulturen abgeimpften Stämme nahezu keine Luftmycelbildung und müssen erst durch mehrere Passagen wieder dazu gebracht werden. Ein weiterer Nachteil der Öl-Kulturen ist, daß nur eine sehr begrenzte Anzahl von Abimpfungen aus einem Röhrchen möglich ist.

Um jederzeit „gebrauchsfertige“ Stämme mit guter Sporenbildung bereit zu halten und um die bei Schrägröhrchen-Kulturen notwendigen zeitraubenden vierteljährlichen Abimpfungen zu umgehen, machten wir Versuche, Streptomycceten in sterilen Substraten zu konservieren. Außerdem wollten wir damit die durch häufige Überimpfungen leicht auftretenden Degenerations- und Ausleseerscheinungen vermeiden. Versuche mit Sand-Talkum-Gemischen verliefen wenig befriedigend. Nach einem halben Jahr waren die meisten Kulturen tot. MARTIN legte deshalb im hiesigen Institut vor 2½ Jahren Kulturen von einzelnen Stämmen in steriler Erde an (vgl. MARTIN u. PAMPUS 1956). Dabei zeigte es sich, daß nicht nur gut versportete Stämme, sondern auch solche, die auf den üblichen Nährböden kein Luftmycel bilden, sich ohne weiteres konservieren lassen. Ermutigt durch dieses Ergebnis wurden vor 1½ Jahren von einer größeren Anzahl gut beschriebener Stämme Erdkulturen angelegt. Das Impfmateriel für diese Erdkulturen stammte sowohl aus sehr gut versporteten Haferflocken-Agar-Röhrchen¹ als auch aus Glycerin-Glykokoll-Agar-Röhrchen mit guter bis mäßiger Versporung. Verschiedene Abimpfungen im Laufe dieser 1½ Jahre ergaben bei allen Stämmen kräftig wachsende, sehr gut versportete Kulturen. Durch verschiedene Vorkultur bedingte Unterschiede im Wachstum, in der Versporung und in der Farbstoffbildung waren nicht zu erkennen.

Um eine größere Anzahl von Stämmen ohne großen Aufwand konservieren zu können, galt es, ein möglichst einfaches Verfahren zur Anlage von Erdkulturen zu entwickeln. Folgendes Verfahren erfüllte diese Anforderungen:

Löblehm (der hier verwendete stammte vom Kaiserstuhl) wird grob zerkleinert und bei 40°C im Trockenschrank etwa einen Tag getrocknet. Danach kann er in der

¹ Nach E. KÜSTER (persönliche Mitteilung). 20 g Haferflocken werden in 1 l Leitungswasser 20 min gekocht, nach dem Abkühlen abzentrifugiert und die überstehende Lösung auf 1 l aufgefüllt. Danach werden 2% Agar zugesetzt, gut verkocht und der Nährboden auf pH 7,2 eingestellt.

Kugelmühle gemahlen werden ohne zu klumpen. Nach 2—3stündigem Mahlen wird die Erde gesiebt (Maschenweite 0,12 mm) und mit Quarzsand (Korngröße etwa 1 mm) im Verhältnis Erde zu Sand wie 6 : 4 gemischt. Man knetet 1 kg dieses Gemisches mit 75 cm³ Leitungswasser (25% des Wasserhaltevermögens) gut durch, bis eine krümelige Struktur erreicht ist. Es bilden sich dabei um die Sandkörner kleine Erdkügelchen. Je 5 g dieser Mischung werden in Reagenzgläser (160 × 16 mm) gefüllt und durch mit Mull umwickelte Wattestopfen verschlossen. Die Sterilisierung erfolgt an drei aufeinander folgenden Tagen je eine halbe Stunde bei 2,5 atü¹. Nach dem Sterilisieren standen die Röhrchen bis zu ihrer Verwendung bei Zimmertemperatur und trockneten langsam aus.

Zur Anlage der Erdkulturen verwendeten wir nur gut bewachsene Schrägröhrchen. Unter sterilen Bedingungen werden diese Kulturen mit je 1 cm³ sterilem Wasser übergossen, die Sporen mit der Impföse abgekratzt und die Sporensuspensionen in sterile Erdröhrchen gegossen. Es kommt dabei etwa so viel Suspension in das Erdröhrchen, wie 25% des Wasserhaltevermögens der Erde entspricht. Durch kräftiges Schütteln wird sofort diese Flüssigkeitsmenge auf die Erde verteilt, die dann, eben durchfeuchtet, sofort krümelige Struktur annimmt. Wird zuviel Wasser zugegeben, so erfolgt sofort Klumpenbildung, und die gleichmäßige Verteilung der Sporen auf die Erde ist nur schwer möglich. Außerdem kann in den unteren Schichten des Röhrchens durch die stagnierende Nässe Luftmangel eintreten und dadurch das Anwachsen der Sporen verhindert werden. Um die Stopfen vor dem Verstauben zu schützen, werden Fingerlinge über die Röhrchen gezogen.

Die Röhrchen bleiben bei Zimmertemperatur stehen. Die Sporen keimen dabei, wachsen aber nur wenig, da bald Nährstoffmangel eintritt. Sie bilden jedoch sehr bald und sehr kräftig Sporen aus (siehe ERIKSON 1947). Dies ist auch auf anderen Hungernährböden der Fall (ERIKSON 1947, LINDENBEIN 1952, FROMMER 1955). Die Sporenzahl nimmt also erst ab (Keimung) und dann langsam wieder zu. Nach etwa 1—2 Monaten sind die Röhrchen lufttrocken, die Sporenbildung hat ihr Maximum erreicht. Diese Röhrchen werden auf Infektionen geprüft und dann bei 3—5°C aufbewahrt.

Mit dieser Methodik haben wir in den letzten Monaten von etwa 700 verschiedenen Streptomycetenstämmen Erdkulturen angelegt. Alle Erdkulturabimpfungen wuchsen an. Die Luftmycelbildung war in den meisten Fällen durch die Erdpassage gefördert (siehe auch ERIKSON 1947). Man hat also in diesen Erdkulturen ständig „gebrauchsfertige“ Stämme zur Verfügung und erspart außerdem noch die bei den lyophilisierten

¹ Nach BAKERSPIGEL (1953) und nach eigenen Versuchen reicht eine einmalige Sterilisation von 30 min bei 2,5 atü aus, wenn man der Erde 25% ihres Wasserhaltevermögens an Wasser zugibt. Um jedoch jegliches Risiko einer Fremdinfection auszuschalten, zogen wir eine mehrmalige Sterilisation vor.

Kulturen nach jeder Abimpfung notwendige Neuanlage der Stammkultur. Wie lange diese Erdkulturen am Leben bleiben, darüber wird zu einem späteren Zeitpunkt zu berichten sein.

Zusammenfassung

An Hand eines größeren Materials wird über die Haltbarkeit von Streptomyceten-Öl-Kulturen berichtet. Nach 4—6 Jahren wuchsen 5% nicht mehr an. Die am Leben gebliebenen zeigten meist keine Luftmycelbildung mehr und mußten durch Passagen erst regeneriert werden.

Eine für Sammlungen geeignete Methode zum Anlegen von Streptomyceten-Erdkulturen (in Lößlehm) wird beschrieben; sie wuchsen nach 1½ Jahren alle an, meist unter Förderung der Luftmycelbildung.

Herrn Prof. Dr. H. BROCKMANN möchte ich für mannigfache Unterstützung danken.

Literatur

- BAKERSPIGEL, A.: *Mycologia* **45**, 596 (1953). — BUELL, C. B., and W. H. WESTON: *Am. Jour. Bot.* **34**, 555 (1947). — CARVAJAL, F.: *Mycologia* **45**, 209 (1953). — ERIKSON, D.: *J. Gen. Microbiol.* **1**, 45 (1947). — FROMMER, W.: *Arch. Mikrobiol.* **23**, 385 (1955). — HARTSELL, S. E.: *Bacteriol. Rev.* **19**, 280 (1955). — HAYNES, W. C., L. J. WICKERHAM and C. W. HESSELTINE: *Appl. Microbiol.* **3**, 361 (1955). — JONES, K. L.: *J. Bacteriol.* **51**, 211 (1946). — LINDENBEIN, W.: *Arch. Mikrobiol.* **17**, 361 (1952). — MARTIN, H. H., u. G. PAMPUS: *Arch. Mikrobiol.* **25**, 90 (1956). — RAPER, K. B., and C. THOM: *A Manual of the Penicillia*. Baltimore: The Williams & Wilkins Company 1949. — THOM, C., and K. B. RAPER: *A Manual of the Aspergilli*. Baltimore: The Williams & Wilkins Company 1945.

(Aus dem Protozoologischen Laboratorium der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Prag)

Ist der Photoreceptor eine unabhängige Organelle der Eugleniden?

Von

JIŘÍ VÁVRA

(Eingegangen am 21 Juni 1956)

Der lichtperzipierende Apparat bei *Euglena gracilis* Klebs wird durch zwei Organellen gebildet: Stigma und Photoreceptor. Das Stigma selbst besteht aus dem farblosen Stroma, welches auf seiner Oberfläche ein Häufchen von carotinoiden Granula trägt (HOLLANDE, 1942). Nach WALD (1943) und MANTEN (1948) bestehen diese Granula aus β -Carotin. Unter diesem Pigmentfleck liegt auf der dickeren Wurzel der Geißel eine linsenförmige Verdickung, der Photoreceptor, manchmal auch paraflagellares Körperchen genannt. Man nimmt an, daß nur der Photoreceptor das Licht aufnimmt und daß das Stigma ihn nur beschattet, um damit die Richtung wahrzunehmen, aus der das Licht kommt, wodurch eine positive phototaktische Reaktion ermöglicht wird (MAST, 1927; BÜNNING u. SCHNEIDERHÖHN, 1956). PRINGSHEIM (1937) schreibt dem Stigma allein Lichtempfindlichkeit zu.

Bekanntlich können einige Stämme von *E. gracilis* Klebs die Plastiden dauernd verlieren, entweder aus unbekannten Gründen („Mutation“—LWOFF, 1943), oder durch die Wirkung des Streptomycins (PROVASOLI u. a., 1948; JÍROVEC, 1949; PRINGSHEIM, 1952), durch Kultur bei erhöhter Temperatur (PRINGSHEIM, 1952), oder durch die Wirkung des Pyribenzamins (GROSS u. JAHN, 1955). Mit dem Verlust der Plastiden ist oft der Verlust von Stigma und Photoreceptor verbunden. So stellte z. B. HOVASSE (1948) fest, daß die farblosen Rassen von *E. gracilis* weder Stigma noch Photoreceptor haben. JÍROVEC (1949) hat beobachtet, daß einige Stämme von *E. gracilis* das Stigma auch durch Wirkung des Streptomycins verlieren. PRINGSHEIM (1952) hat die Wirkung des Streptomycins und der Kultur bei erhöhter Temperatur auf mehrere Stämme von *E. gracilis* durchgearbeitet und festgestellt, daß es möglich ist, unter den Stämmen der Euglenen, bei welchen es zum Verlust der Chromatophoren kommt, 3 Gruppen zu unterscheiden, je nachdem wie ihr Stigma auf Streptomycin reagiert. Bei der 1. Gruppe verschwindet das Stigma nach dem Verlust der Chromatophoren niemals, bei der 2. Gruppe hingegen verschwindet es gleichzeitig mit den Plastiden, bei der 3. Gruppe erhält es sich auch nach Verlust der Chromatophoren, aber nur beim Aufenthalt am Licht, im Dunkeln verschwindet es. Wo es nicht zum Verlust der Chromatophoren kommt, bleibt auch das Stigma dauernd erhalten.

Beim Studium der Wirkung des Streptomycins auf die Stämme von *E. gracilis* aus unserer Sammlung von Protozoen-Kulturen habe ich das Vorhandensein des Stigmas im normal beleuchteten Mikroskop und auch

im „blauen Lichte“ beobachtet (VÁVRA, 1956), in welchem die Chloroplasten und Carotinoide dunkel erscheinen. Weiter wurde das Stigma an nach Heidenhain gefärbten Schnittpräparaten untersucht, an denen der Photoreceptor sehr gut zu sehen ist. Auch das Phasenkontrastmikroskop (Zeiss-Lumipan) erlaubt, den Photoreceptor gut zu unterscheiden.

Bei dem Stamm „Mainx“ habe ich niemals den Verlust des Stigmas bemerkt, nicht einmal, wenn die ganz entfärbten Flagellaten im Dunkeln gezüchtet wurden. JÍROVEC (1949) ist es dagegen gelungen, den Stamm „Mainx“ vom Stigma zu befreien; dieser Stamm hat, obwohl er am Lichte gehalten wurde, das Stigma endgültig verloren. Wie ich aber festgestellt habe, bleibt bei diesen schon seit 9 Jahren farblosen Flagellaten (ohne Chloroplasten und ohne Stigma!) der Photoreceptor erhalten. Man glaubte bisher, daß der Verlust des ganzen Stigmas oder wenigstens dessen Carotinanteils, auch den Verlust des Photoreceptors bedingt. Nach HOLLANDE (1942) verschwindet der Photoreceptor auch bei Flagellaten, welche ein Leukostigma haben. *Astasia quartana* z. B. hat das gefärbte Stigma und auch den Photoreceptor, *Astasia captiva* und *Astasia mobilis* haben Leukostigmen; da aber dieses Stigma farblos ist, fehlt auch der Photoreceptor. Ähnlich ist der Photoreceptor bei *Astasia longa*, wo das Stigma überhaupt fehlt, nicht vorhanden.

Die Anwesenheit des Photoreceptors bei meinem entfärbten Stamm „Mainx“ konnte ich ganz sicher feststellen, nicht nur in vivo in dem Phasenkontrast, sondern auch an gefärbten Präparaten. Der Photoreceptor weist auch kein Zeichen der Degeneration auf; er ist gleich groß und hat das gleiche Aussehen wie bei den grünen Formen. Ein Stigma ließ sich aber auf keine Art nachweisen. Der Photoreceptor ist also von der Anwesenheit des Stigmas nicht abhängig, und wir müssen auch dem Photoreceptor eine gewisse selbständige Stellung unter anderen Organellen zugestehen.

Leider ist es nicht gelungen, die Beseitigung des Stigmas bei dem Stamm „Mainx“ zu wiederholen; bei allen meinen Versuchen und unter allen Versuchsbedingungen blieb bei diesem Stamm das Stigma erhalten. Es ist möglich, daß dieser Mangel an Übereinstimmung zwischen meinen Versuchen und den Ergebnissen von JÍROVEC dadurch verursacht ist, daß in seinen Versuchen entweder ein durch lange Jahre an das Dunkel adaptierter Stamm, dessen Stigma vielleicht für die Wirkung des Streptomycins empfindlicher war, benützt wurde, oder daß ein anderer, bisher unbekannter Faktor mitgespielt hat. Das Suchen nach diesem Faktor ist das Ziel unserer weiteren Arbeit.

Zusammenfassung

Bei einem schwer entfärbbaren Stamm von *Euglena gracilis* traten nach Streptomycin-Behandlung dauernd farblose Zellen auf, die aber das Stigma beibehalten hatten. Dieses ging nur einmal bei dieser

Behandlung mit den Chromatophoren zusammen verloren. Es zeigte sich aber, daß der Photoreceptor am Grund der Bewegungsgeißel in diesem Falle nicht verschwunden war. Er ist demnach ein vom roten Fleck unabhängiges Zellorgan.

Literatur

- BÜNNING, E., u. G. SCHNEIDERHÖHN: Über das Aktionsspektrum der phototaktischen Reaktionen von *Euglena*. Arch. Mikrobiol. **24**, 80—90 (1956). — GROSS, J. A., and T. L. JAHN: Microscopic Observations on *Euglena* During Exposure to Antihistamine. J. Protozool., 2. suppl. (1955). — HOLLANDE, A.: Étude cytologique et biologique de quelques Flagellés libres. Arch. Zool. expér. **83**, 1—268 (1942). — HOVASSE, R.: Étude cytologique d'Euglènes vertes et incolores du type *Euglena gracilis*. In PRINGSHEIM E. G. 1948. — HUTNER, S. H., and L. PROVASOLI: The Phytoflagellates. In A. LWOFF: The Biochemistry and Physiology of Protozoa, New York 1951. — JÍROVEC, O.: Der Einfluß des Streptomycins und Patulins auf einige Protozoen. Experientia (Basel) V/2, 74—77 (1949). — Účinek antibiotik na některé prvoky. Věst. Čsl. Zool. spol., **13**, 216—238 (1949). — LWOFF, A.: L'évolution physiologique. Paris 1943. — MANTEN, A.: Zit. S. H. HUTNER 1951. — MAST, S. O.: Structure and function of the eye-spot in unicellular and colonial organisms. Arch. Protistenk. **60**, 197 (1927). — PRINGSHEIM, E. G.: Über das Stigma bei farblosen Flagellaten. Cytologia, Fujii-Jubiläumsband, 234—255 (1937). — The loss of Chromatophores in *Euglena gracilis*. New Phytologist **47**, 1, 52—87 (1948). — Experimental elimination of Chromatophores and eye-spot in *Euglena gracilis*. New Phytologist **51**, 1, 65—76 (1952). — PROVASOLI, L., S. H. HUTNER and A. SCHATZ: Streptomycin induced chlorophyll-less races of *Euglena*. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **69**, 279—282 (1948). — VÁVRA, J.: Zobrazení chloroplastů v modrém světle. Čsl. Biologie **5**, 1, 55—56 (1956). — WALD, G.: Zit. S. H. HUTNER 1951.

(Aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft,
Institut für Bakteriologie, Berlin-Dahlem)

Die Bedeutung einiger Spurenelemente für *Cellvibrio*- und *Cytophaga*-Arten*

Von

H. BORTELS

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 6. Juli 1956)

Um die Verbreitung der cellulosezersetzenden Gattungen *Cellvibrio* und *Cytophaga* in verschiedenen Böden vergleichsweise zu ermitteln, wurden im Verlauf der Jahre 1949 bis 1955 250 europäische, vornehmlich westdeutsche Böden untersucht.

In 2 Petrischalen von 10 cm Durchmesser wurden in Anlehnung an die Methode von STANIER (1942a) jeweils 7 kleine naturfeuchte Krümel aus der obersten 0 bis 10-cm-Schicht eines Bodens in etwa gleichen Abständen auf einem die Schale ausfüllenden, runden Filtrierpapier ausgelegt, das einer dickeren Schicht von 20 cm³ Mineralsalzagar folgender Zusammensetzung auflag: H₂O 100; NaNO₃ 0,2; K₂HPO₄ 0,1; MgSO₄ · 7 H₂O 0,05; KCl 0,05; FeSO₄ · 7 H₂O 0,002; MnSO₄ · H₂O 0,0002; CaCO₃ 0,02, Agar 1,0.

Nachdem die Bodenproben auf dem Papier 7 Tage bei 25—27° C bebrütet worden waren, ließen sich die in ihrer Umgebung ausgewachsenen Mikroorganismen mikroskopisch als Bakterien (meistens Vibrionen) oder Cytophagen identifizieren. Die ebenfalls, besonders aus sehr sauren Böden sich entwickelnden Pilze und die seltener auftretenden, nicht zur Gattung *Vibrio* gehörenden cellulosezersetzenden Bakterien sollen hier weiterhin unbeachtet bleiben. Auf einen pH-Bereich von 3—9 verteilen sich die untersuchten Feld-, Wiesen-, Wald- und Moorböden derart, daß von ihnen 65, 65, 20, 35, 45, 20 in die pH-Gruppen 3—4, 4—5, 5—6, 6—7, 7—8 bzw. 8—9 einzuordnen sind.

In Abb. 1 sind die Verhältnisse der Anzahl von Bodenkrümeln mit Cytophagen- bzw. Bakterienentwicklung zur Anzahl der untersuchten Böden für die verschiedenen pH-Bereiche dargestellt. Das pH-Optimum für Vibrionen liegt erwartungsgemäß im schwach alkalischen Gebiet, dasjenige für Cytophagen dagegen im sauren Bereich. Ähnliches fand JENSEN (1931). Daß aber auch hier im schwach sauren Gebiet Vibrionen im Durchschnitt noch zahlreicher zur Entwicklung kamen als Cytophagen (das Verhältnis dieser zu jenen erreichte im Maximum nur etwa 0,4), mag daran liegen, daß Cytophagen wahrscheinlich in Böden allgemein nicht so sehr verbreitet sind wie cellulosezersetzende Vibrionen. Jedoch

* Einiges hierüber wurde schon 1953 anläßlich der Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie in Düsseldorf vorgetragen (BORTELS 1953).

kommen zusätzlich auch methodische und andere Ursachen in Betracht, über die in einer weiteren Mitteilung berichtet werden soll.

Die in gleicher Weise auch von HARMSEN (1946) beschriebene Verteilung der Cytophagen und Cellvibrionen in Böden verschiedener pH-Werte gab Veranlassung, das Bedürfnis der beiden Gattungen an gewissen Spurenelementen, besonders an Schwermetallen, die bei neutraler bis alkalischer Reaktion mehr oder weniger vollständig aus der Bodenlösung verschwinden, zu untersuchen und zu vergleichen.

FÄHRAEUS (1941, 1947) hat schon festgestellt, daß Cytophagen durch geringe Mengen Calcium und Mangan neben den anderen mineralischen Bestandteilen eines Nährmediums in ihrer Entwicklung gefördert werden. Später jedoch haben SLPSTEIJN u. FÄHRAEUS (1949) die beiden von ihnen verwendeten Nährsubstrate, nämlich das von DUBOS ohne und das von ihnen selbst angegebene Medium *g* mit Calcium und Mangan für gleich gut brauchbar erklärt. STANIER (1942a) hat sich über die Bedeutung des Calciums und Mangans in der von ihm verwendeten Leitungswasser-Nährlösung nicht geäußert, und auch SPEYER (1953) ist der Meinung, daß „eine genaue Zusammensetzung der Nährlösung ... von untergeordneter Bedeutung, ... die Einhaltung eines sehr engen Reaktionsbereiches von pH 6,6 bis 7,8 ...“ dagegen sehr wichtig sei.

Es blieb also noch festzustellen, ob diese beiden Spurenelemente und darüber hinaus vielleicht noch andere tatsächlich von den Cytophagen in verhältnismäßig größeren Mengen benötigt werden, und ob andererseits Zellvibrionen in dieser Hinsicht weniger anspruchsvoll oder sogar gegenüber den in Betracht kommenden Konzentrationen empfindlich sind. Denn sie sind im Gegensatz zu den Cytophagen in sauren Böden mit entsprechend höherem Gehalt an gelösten Schwermetallen weniger zahl- und artenreich vertreten als in neutralen bis schwach alkalischen. Es war mit andern Worten zu prüfen, ob die Spurenelemente als maßgebliche ökologische Faktoren für die Verbreitung beider Gattungen anzusehen sind.

Bereits in früheren Versuchen des Verfassers (BORTELS 1929) mit anderen Zielen haben sich auf aschefreien Filtern in besonders gereinigten Lösungen, die außer Eisen zunächst keine Schwermetalle enthielten, nach Zusatz von Gerstenasche spontan Cytophagen entwickelt und die

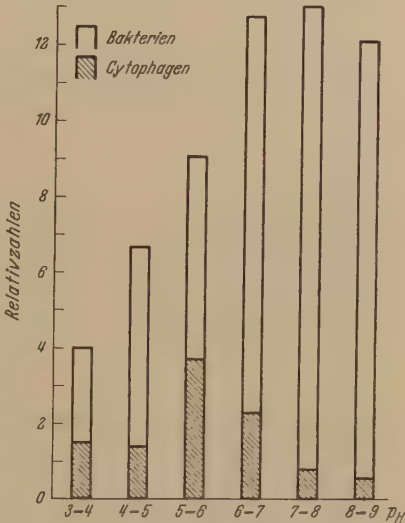


Abb.1. Anzahl der mit Cytophagen bzw. Bakterien bewachsenen Bodenproben im Verhältnis zur Gesamtzahl der untersuchten Böden. 1949—1955

Filter in kurzer Zeit zerstört. Das geschah immer nur in den Lösungen mit Gerstenasche, die natürlich unter anderem auch Schwermetalle enthielt, und immer waren es Cytophagen und keine Vibrionen. Wenn später (STAPP u. BORTELS 1934) keine besondere Wirkung verschiedener Aschen auf die Entwicklung von cellulosezersetzenden Bakterien und Cytophagen festgestellt werden konnte, dann hatte das sicher seinen Grund in dem damals für die Nährsubstrate verwendeten Berliner Leitungswasser und dem aschereichen Filtrierpapier. Denn beides enthält außer Calcium auch reichlich Eisen und Mangan.

Bei den später in Braunschweig durchgeführten Versuchen mit den oben genannten Zielen wurden wieder Nährlösungen mit destilliertem Wasser verwendet. Dabei stellte es sich heraus, daß die anfangs nur in Roh- oder Mischkulturen aus Erde gezüchteten *Cytophaga*-Stämme in schwach sauren Lösungen mit Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle besser gediehen als in schwach alkalischen mit Natriumnitrat. Ebenfalls frisch aus Erde isolierte *Cellvibrio*-Arten bevorzugten dagegen schwach alkalische Lösungen mit Nitrat. Noch besser als in den sauren synthetischen und besser als in Leitungswasser-Nährlösungen entwickelten sich die Cytophagen in manganhaltiger Lösung nach FÄHRÆUS (1941, 1947).

Schon bei diesen ersten orientierenden Vorversuchen mit rohem Filtrierpapier als Cellulosequelle fiel die verhältnismäßig große Eisenbedürftigkeit oder -verträglichkeit der Cytophagen gegenüber den Vibrionen auf. Während diese in der eingangs erwähnten Grundnährlösung zum Teil schon durch 1 mg Ferrosulfat in 100 cm³ gehemmt wurden, entwickelten sich Cytophagen auch noch mit der zehnfachen Menge unvermindert gut. Nachdem dann ferner festgestellt werden konnte, daß Erdextraktasche in synthetischer, eisenhaltiger Nährlösung eine weitere fördernde Wirkung auf die Entwicklung von Cytophagen ausübte und daß diese Wirkung offenbar von Bestandteilen ausging, die unlösliche Sulfide bildeten, war im Hinblick auf die Beobachtungen von FÄHRÆUS (1941, 1947) die Annahme berechtigt, daß es sich dabei um Mangan handelte. Aber auch nach Zusatz von Mangansulfat zu den synthetischen Lösungen blieben diese in ihrer Brauchbarkeit trotz einer gewissen Verbesserung noch immer hinter den aschehaltigen zurück, ein Zeichen dafür, daß die verwendeten Erdextraktaschen weitere für die cellulosezersetzenden Cytophagen wichtige Elemente enthalten mußten. Diese schienen zum Teil ebenfalls unlösliche Sulfide zu bilden und dann durch Adsorption aus den Lösungen leicht entfernbar zu sein. Daneben aber machte sich eine besonders deutlich fördernde Wirkung der Erdextraktasche für Cytophagen wie für Vibrionen dann bemerkbar, wenn die Nährlösung mit einer Spur Soda und nachfolgender Kohleadsorption der gefällten Carbonate vorbehandelt wurde. Es schien also für die

Ernährung dieser Organismen noch ein Element wichtig zu sein, das ein unlösliches Carbonat bildet und nicht durch Sulfid fällbar ist. Nach längerem Tasten, das sich deshalb solange hinzog, weil die nunmehr als Cellulosequelle benützten aschefreien Filter, wie sich schließlich herausstellte, zum Teil wahrscheinlich Flußsäure¹ in für die Organismen giftigen Mengen enthielten, ergaben sich dann doch endlich Kupfer und Calcium als diejenigen Elemente, die bis dahin noch in den synthetischen Lösungen gefehlt hatten. Wenn diesen jetzt außer Eisen auch Calcium, Mangan und Kupfer als Chloride bzw. als Sulfate in annähernd optimalen Konzentrationen zugesetzt wurden, dann waren sie oft noch besser für die Züchtung von Cytophagen geeignet als Nährlösungen mit Erdextraktasche. Somit stand der Durchführung quantitativer Vergleichsversuche nichts mehr im Wege.

Solche quantitativen Versuche wurden immer mit doppelt oder dreifach über Quarz destilliertem Wasser, analysenreinen Salzen und aschefreien Rundfiltern durchgeführt. Gegebenenfalls mußten diese Filter, wenn sie Spuren von Flußsäure enthielten, mit einer Sodalösung ausgekocht und dann wieder mit doppelt destilliertem Wasser bis zur neutralen Reaktion gewaschen werden. Jeweils die Hälfte eines Filters wurde dann an die Innenwand eines 100 cm³ fassenden, mit Chromschwefelsäure und doppelt destilliertem Wasser gereinigten Erlenmeyerkolbens aus Jenaer Glas Nr. 20 so angelegt, daß die abgerissene gerade Kante in die 25-cm³-Nährlösung aller Kolben gleich tief eintauchte.

Die Grundnährlösung, auf deren besondere Reinigung stets verzichtet wurde, bestand bei den im folgenden beschriebenen Versuchen aus Aqua bidest. 100, NaNO₃ 0,2; K₂HPO₄ 0,05 und MgSO₄ · 7 H₂O 0,02. Im ersten Versuch wurden dieser Grundnährlösung außerdem zugesetzt MnSO₄ · 7 H₂O 0,01; FeSO₄ · 7 H₂O 0,002; CaCl₂ 0,002 oder CuSO₄ · 5 H₂O 0,00001 oder eine von allen möglichen Kombinationen oder CaCl₂ + FeSO₄ · 7 H₂O + Asche von Erdextrakt. Nach der üblichen dreimaligen Sterilisation im Dampftopf wurden die Kölbchen mit jeweils einem Tropfen einer Aufschlammung der Reinkultur von *Cellvibrio vulgaris*, Stamm 2 (farblos, aus Kompost) oder der Rohkulturen von *Sporocytophaga myxococcoides*, Stamm 13 (hellgelb, aus Schwarzerde) oder Stamm 4 (gelb, aus Laubkompost) oder Stamm 5 (eigelt, aus Stallmist) beimpft. Das Impfmateriel ist immer in Lösungen aus einfach destilliertem Wasser und nicht analysenreinen Salzen und Papieren ohne besonderen Spurenelementzusatz vorgezüchtet worden, hier mit Filtrierpapier, später zum Teil auch mit Glucose als Kohlenstoffquelle.

Nach etwa einer Woche hatten sich die Kulturen soweit entwickelt, daß sich am Gesamtbild nichts mehr änderte und die Versuche quantitativ ausgewertet werden konnten. Zu diesem Zwecke wurden die Nährlösungen einschließlich der Filter mit je 2 cm³ konzentrierter Salzsäure kurz aufgeköcht, um den Schleim zu lösen und die restliche Cellulose zurückwägen zu können. Denn ein vollständiger Celluloseabbau durch die Organismen konnte bei dieser Kultivierungsmethode auch in optimal zusammengesetzter Nährlösung nicht erreicht werden. Dazu war der Stoffaustausch und die Durchfeuchtung der weit aus der Lösung herausragenden oberen Teile der Filter viel zu gering, besonders wenn in Nähe des Flüssigkeitsmeniskus die Papierzerstörung schon weit fortgeschritten war. Außerdem wachsen die streng aeroben Organismen nicht auf dem untergetauchten Teil des Filters.

¹ FÄHRÆUS (1947) hat das ebenfalls festgestellt.

Die salzsaure Celluloseaufschlämmung wurde dann zentrifugiert, nach Abgießen der Säure wieder mit Leitungswasser aufgeschlämmt, abermals zentrifugiert, von der Cellulose abgegossen und diese dann bei 100° C getrocknet, auf Zimmertemperatur abgekühlt und lufttrocken gewogen. Nach Abzug dieses Gewichtes vom zuvor bestimmten Anfangsgewicht jeweils desselben Filters ergaben sich die prozentualen Mengen zersetzter Cellulose¹. Sie sind für diesen ersten Versuch aus Abb. 2 zu entnehmen.

Wurde zur Grundnährlösung zusätzlich nur Calciumchlorid gegeben (Calciumcarbonat wirkte ähnlich, und Natriumchlorid blieb wirkungslos), dann war sie für *Cellvibrio vulgaris* 2 in diesem Falle schon optimal zusammengesetzt. Eisen nämlich war anscheinend mit dem Impfgut und den Chemikalien schon in solchen Mengen in die Nährlösung hineingekommen, daß sie für diesen hinsichtlich Eisen offenbar besonders anspruchslosen *Vibrio*-Stamm bereits ausreichten, nicht dagegen für die Cytophagen. Sie fanden ihr Optimum erst, wenn außer Calcium mindestens noch Eisen und Mangan als Sulfate gegeben worden waren, die Stämme 4 und 5 sogar erst in den Lösungen, die außer den genannten Spurenelementen noch Kupfer als Sulfat bekommen hatten. Dieser deutliche Unterschied zwischen *Cellvibrio* und *Sporocytophaga* in ihren Ansprüchen bezüglich der Versorgung mit Spurenelementen wurde durch einen weiteren Vergleich zwischen den Stämmen *Cellvibrio* 2 und *Sporocytophaga* 4 bestätigt. In der in Abb. 2 gewählten Reihenfolge der 4 verschiedenen Cellulosezerersetzer wird das erste Maximum links oben über Calcium nur von *Cellvibrio* erreicht, während umgekehrt das Maximum ganz außen rechts über Calcium, Eisen, Mangan und Kupfer von oben nach unten allmählich höher wird. Wir nehmen also zwischen den einzelnen Stämmen einen gleitenden Übergang wahr, in dem *Sporocytophaga* 13 eine Mittelstellung einnimmt. Dieses Verhalten mag den natürlichen Standorten der betreffenden Stämme entsprechen. Kultur 13 stammt aus Schwarzerde, die mehr Calcium und weniger Mangan und Kupfer gelöst enthalten dürfte als der schwachsaure Laubkompost, aus dem Kultur 4 isoliert wurde. Es ist weiterhin auffallend, daß Eisen bei Gegenwart von Calcium und Mangan nur bei Kultur 5 ohne Depression durch Kupfer ersetzt werden konnte.

Calcium ist für Cytophagen ebenso notwendig wie für Vibrionen, während Mangan wenigstens für den farblosen *Cellvibrio* 2 bedeutungslos, für die gelb bis orange gefärbten Cytophagen aber um so unentbehrlicher zu sein scheint. Leider konnten keine farblosen *Cytophaga*-Stämme gezüchtet werden, so daß die Frage, ob solche ebenso wie die farblosen Vibrionen keiner besonderen Mangangabe bedürfen, offen bleiben muß. Wir werden jedoch sehen, daß ein besonders reichlich braunen Farbstoff bildender *Cellvibrio* bei erhöhter Mangankonzentration etwas besser

¹ Für die hier angestrebte Bestimmung von Vergleichswerten war die Genauigkeit der Methode ausreichend.

gedeiht und unter Umständen auch mehr Farbstoff bildet. Diese braune Art entspricht in Form und Farbe dem früher (STAPP u. BORTELS 1934) beschriebenen *Cellvibrio fulva*, der bezeichnenderweise in Leitungswasser-Nährlösung bei rostbrauner Färbung energischer Cellulose angriff als bei

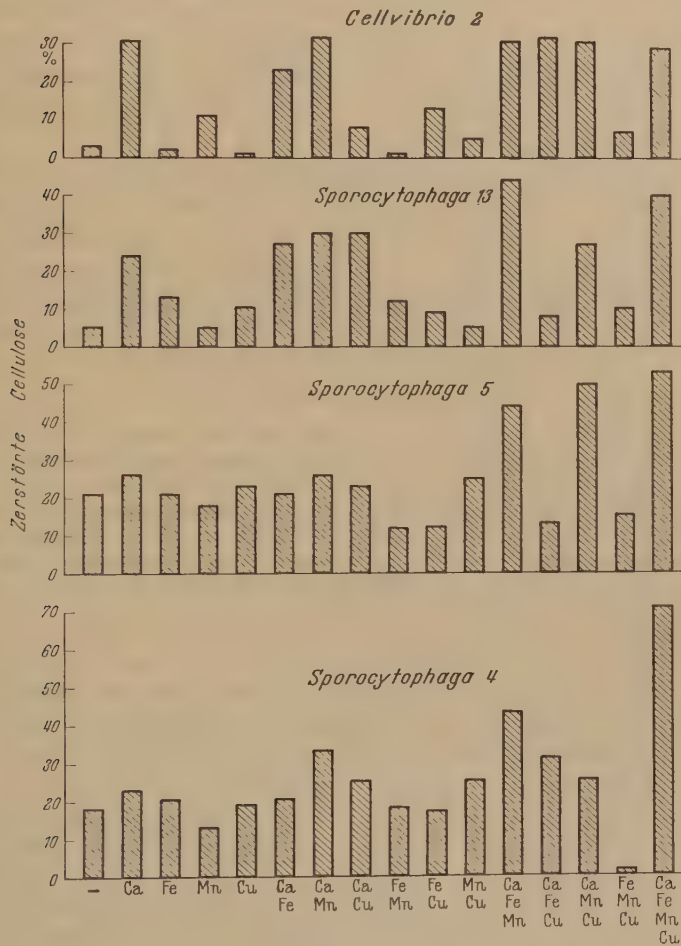


Abb. 2. Die Bedeutung einiger Spurenelemente für die Cellulosezersetzung durch *Cellvibrio* und *Sporocytophaga*. 4.—12. 5. 1949

blaßgelber Färbung in Aqua dest.-Nährlösung. Demnach scheint ein gleitender Übergang zu bestehen von farblosen Cellvibrionen, die Cellulose in synthetischen Nährmedien schon ohne Zugabe von Eisen-, Mangan- und Kupfer-Salzen intensiv zerstören, über gelbe bis braune Arten dieser Gattung, die zur maximalen Wirkung schon etwas mehr

dieser Schwermetalle benötigen, und die in dieser Hinsicht ungefähr auf gleicher Stufe stehen wie farblose oder blaß gefärbte *Cytophaga*-Arten, bis zu jenen gelben, braunen oder orange Cytophagen, die außer Eisen auch verhältnismäßig große Mengen Mangan und zum Teil Kupfer benötigen. Es muß umfangreicheren Untersuchungen vorbehalten bleiben, endgültig zu entscheiden, ob diese Beziehung zwischen Farbe und Schwermetall-Bedürftigkeit auch für andere Stämme gilt und ob, wie es vermutet wird, Schwermetallgehalt und Wasserstoffionen-Konzentration der Bodenlösungen am natürlichen Standort dieser verschiedenen Organismen immer entsprechende Werte haben.

Bisher konnte nur in ein paar kleineren Versuchen geprüft werden, wie weit die besprochenen Versuchsergebnisse allgemeine Gültigkeit besitzen. Um dies zu entscheiden, wurden 3 weitere, später aus Erde isolierte Stämme in ähnlicher Weise untersucht, nämlich die farblose Art *Cellvibrio vulgaris* 49 (aus Kompost), der stark braun gefärbte Stamm *Cellvibrio fulva* 52 (aus mooriger Wiese), die keine Cysten bildende orange gefärbte *Cytophaga aurantiaca* 51 (aus moorigem Teichufer) und vergleichsweise nochmals *Sporocytophaga myxococcoides* 4.

Die hierbei verwendeten Filter brauchten nicht mit Soda vorbehandelt zu werden, und zu 100 cm³ Grundnährlösung wurden in den entsprechenden Fällen zugesetzt 2 mg CaCl₂; 2 mg FeSO₄ · 7 H₂O; 1 mg MnSO₄ · 7 H₂O; 0,01 mg CuSO₄ · 5 H₂O oder eine der möglichen Kombinationen. Während die Vibrionen wieder in Reinkulturen vorlagen, enthielt *Cytophaga aurantiaca* 51 von vornherein eine asporogene Rosahefe als Begleitorganismus, die am 11. 6. wegen der verhältnismäßig schlechten Entwicklung der Reinkulturen¹ von *Sporocytophaga* 4 auch dieser zugesetzt wurde.

Als Ergebnis ist aus Abb. 3 wiederum eindeutig zu entnehmen, daß die Vibrionen schon auf Calcium und Eisen (Stamm 49), dagegen nicht oder nur schwach (Stamm 52) auf zusätzlich gegebenes Mangan oder Kupfer ansprachen. Die Cytophagen aber fanden erst wieder in den Lösungen mit Calcium, Eisen und Mangan ihr Optimum vor, denen im Falle *Sporocytophaga* 4 noch Kupfer hinzuzufügen war. Die für Cytophagen offenbar typische Manganbedürftigkeit kam hier bei dem orange gefärbten Stamm 51 besonders deutlich zum Ausdruck, so daß man diesen oder einen ähnlichen Organismus gegebenenfalls zu mikrobiologischen Manganbestimmungen in Böden verwenden könnte (BORTELS u. WETTER 1954). Der in Abb. 3 dargestellte Versuch wurde etwa 6 und 12 Wochen später bei ausschließlicher Berücksichtigung der Lösungen ohne Zusatz, mit Calcium, mit Calcium und Eisen, mit Calcium, Eisen und Mangan, mit Calcium, Eisen und Kupfer und mit Calcium, Eisen, Mangan und Kupfer wiederholt, wobei ein ähnliches Ergebnis erzielt, aber in Abweichung vom bisherigen Verhalten der *Cytophaga* 51 diese auch durch zusätzliche

¹ Über das Problem der Reinzüchtung von *Cytophaga*-Arten soll an anderer Stelle berichtet werden.

Kupfergaben gefördert wurde¹. Etwa 2 Jahre später, vom 12. 11. bis 23. 11. 1953, wurde vergleichsweise der Spurenelementbedarf eines anderen, aber ebenfalls gelben Stammes von *Sporocytophaga myxococcoides* (3, aus Kompost) und nochmals von *Cytophaga aurantiaca* 51 bei der Cellulose-zersetzung untersucht. Dabei hat sich wieder ergeben, daß das Optimum

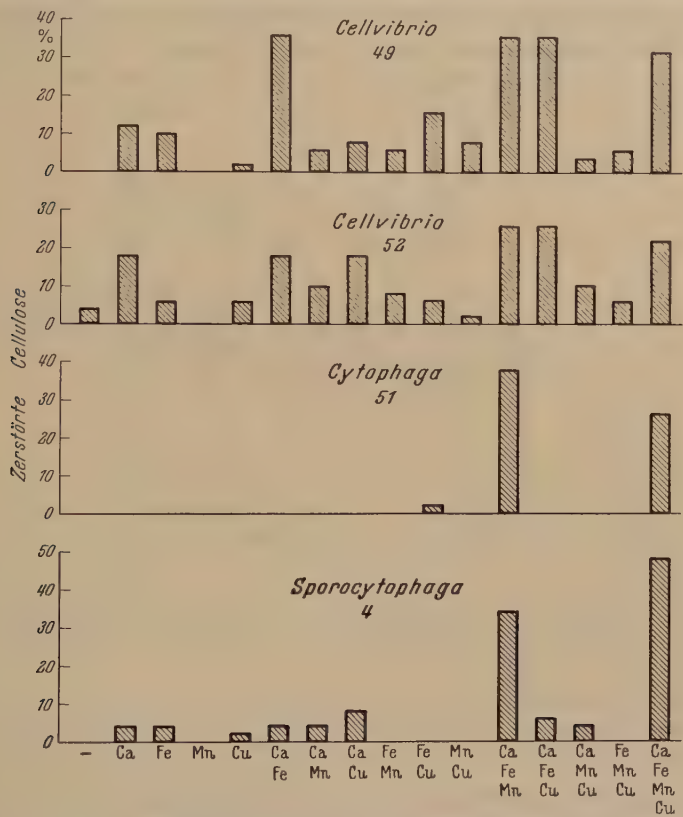


Abb. 3. Die Bedeutung einiger Spurenelemente für die Cellulosezerersetzung durch *Cellvibrio*, *Cytophaga* und *Sporocytophaga*. 5.—19. 6. 1951

für *Cytophaga* 51 bei Calcium, Eisen und Mangan lag und für den *Sporocytophaga*-Stamm 3 bei Calcium, Eisen, Mangan und Kupfer. *Cytophaga* 51 hat fast immer auf Mangan besonders stark angesprochen. Nur einige Male, z. B. vom 19.—26. 10. 1953, war keine Förderung durch Mangan erkennbar. Eine versehentliche Verunreinigung der Nährlösungen mit Mangan erscheint ausgeschlossen.

¹ Zu 100 cm³ wurden diesmal von den analysenreinen Salzen 5 mg CaCl₂, 5 mg FeSO₄ · 7 H₂O, 2 mg MnSO₄ · 7 H₂O bzw. 0,01 mg CuSO₄ · 5 H₂O gegeben, also unter anderem auch mehr Mangan. Von einem physiologischen Antagonismus zwischen Kupfer und Mangan wird weiter unten noch die Rede sein.

Aus allen diesen Versuchen darf aber wohl mit gewissen Vorbehalten der allgemeine Schluß gezogen werden, daß den farblosen Vibrionen, den Bewohnern neutraler bis schwach alkalischer Böden, außer Calcium und Eisen keine anderen Spurenelemente über die in analysenreinen Lösungen vorhandenen Spuren hinaus geboten werden müssen, den braunen, in schwach sauren Böden lebenden Arten allenfalls sehr geringe Mengen Mangan und vielleicht auch Kupfer, den Cytophagen aber mindestens diese geringen Mengen, wenn sie kaum gefärbt sind und aus neutralen

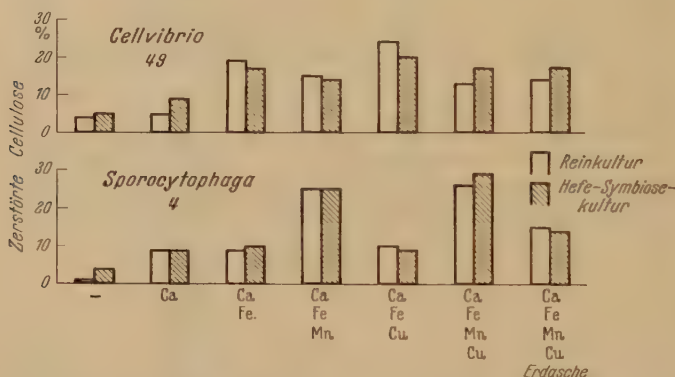


Abb. 4. Die Bedeutung einiger Spurenelemente und von Erdextraktasche für die Cellulosezersetzung durch *Cellvibrio* und *Sporocytophaga* in Rein- und Symbiosekultur. 27. 6.—5. 7. 1952

Böden stammen, und verhältnismäßig größere Mengen Mangan und Kupfer den lebhaft gelb bis orange oder vielleicht auch anders gefärbten Cytophagen aus sauren Böden.

Dabei ist es gleichgültig, ob die Cellulosezer-setzer wie bei den ersten erwähnten Versuchen in Rohkultur vorliegen oder in Reinkultur oder Hefe-Mischkultur. Eine weitere Förderung der Organismen, die über eine durch Calcium, Eisen, Mangan und Kupfer hervorgerufene hinausgeht, trat niemals ein (Abb. 4), so daß von beiden Mikroorganismen-Gruppen vermutlich keine sonstigen Aschenelemente in ähnlich großen Mengen benötigt werden.

Um einen Überblick zu bekommen, in welchen Konzentrationsbereichen größenordnungsmäßig die optimalen Mengen der 4 verschiedenen Elemente zu suchen sind, wurden Calciumchlorid, Ferrosulfat und Mangansulfat in Mengen von 0,2, 2 und 20 mg je 100 cm³ vollständiger Grundnährlösung gegeben und Kupfersulfat in Mengen von 0,001, 0,01 und 0,1 mg. Die gewählten Kombinationen sind der Abb. 5 zu entnehmen. Danach haben auf beide, *Cellvibrio*- und *Sporocytophaga*-Reinkulturen, die mittleren Konzentrationen von Calciumchlorid am günstigsten gewirkt, während den bisherigen Ergebnissen entsprechend

die niedrigste Konzentration von Mangansulfat für *Cellvibrio* 49 noch keine Entwicklungsdepression zur Folge hatte, wohl aber für *Sporocytophaga* 4. Zwischen Calcium einerseits und Mangan andererseits scheinen ebenso wie zwischen den verschiedenen Schwermetallen hier und bei früherer Gelegenheit (Fußnote 1, S. 233) gewisse physiologisch-antagonistische Beziehungen vorgelegen zu haben. So wirkten z. B. 20 mg Ferrosulfat sehr viel stärker hemmend auf die Cellulosezersetzung, wenn gleichzeitig 0,2 statt 2 mg Calciumchlorid gegeben wurden, und umgekehrt 20 mg Calciumchlorid mit 0,2 mg Mangansulfat stärker hemmend

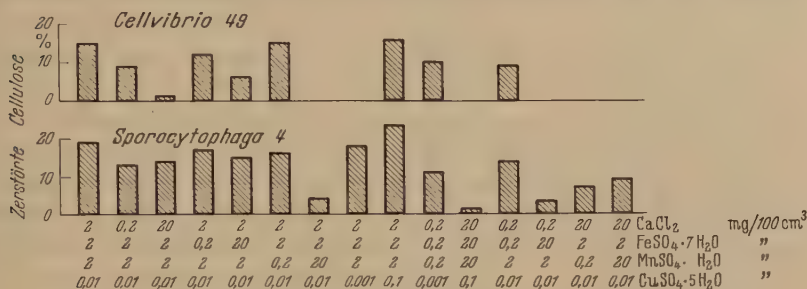


Abb. 5. Die Bedeutung einiger Spurenelemente in verschiedenen Konzentrationen für die Cellulosezersetzung durch *Cellvibrio* und *Sporocytophaga*. 22.—29. 7. 1952

als mit 2 mg, sogar auch bei *Cellvibrio 49*, der bei optimaler Calciumgabe schon ohne besondere Mangangabe ein Maximum der Entwicklung und Cellulosezerstörung erreichte. Diesen antagonistischen Beziehungen wurde jedoch vorläufig nicht weiter nachgegangen, wie auch das auffallend hohe Kupferoptimum (0,1 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ in 100 cm³) für die hier gewählte Kombination noch einer eingehenderen Untersuchung und Klärung bedarf. Merkwürdigerweise ist für *Cellvibrio 49*, der doch sonst ohne jegliche Kupfergabe ausgekommen ist, mit 1 γ Kupfersulfat bei der relativ hohen Mangankonzentration von 2 mg Mangansulfat schon das Minimum unterschritten, nicht aber bei 0,2 mg Mangansulfat je 100 cm³ bei gleichfalls entsprechend niedrigen bzw. hohen Konzentrationen der übrigen Spurenelemente.

In einem weiteren Versuch vom 18.—26. 8. 1952, in dem andere Mengenverhältnisse der untersuchten 4 Elemente gewählt wurden, lag das Maximum zerstörter Cellulose für *Cellvibrio* 49 bei 2 mg Calciumchlorid, 1 mg Ferrosulfat, 0,1 mg Mangansulfat und 0,1 mg Kupfersulfat je 100 cm³, für *Sporocytophaga* 4 dagegen bei 2, 10, 1, bzw. 0,01 mg. *Cellvibrio* 49 schien also auch hier wieder kupferbedürftiger als *Sporocytophaga* zu sein. Während die optimalen Eisen- und Mangankonzentrationen für *Sporocytophaga* wieder deutlich höher lagen als für *Cellvibrio*, lag das Kupferoptimum bei diesen Calcium-, Eisen- und

Mangansalzkonzentrationen von 2, 10 bzw. 1 mg je 100 cm³ für *Cellvibrio* höher. Außerdem wurde mit 0,1 mg Kupfersulfat bei Gaben von 1 mg Ferro- und 10 mg Mangansulfat von beiden Organismen mehr Cellulose zerstört als bei 10 mg Ferro- und 1 mg Mangansulfat, mit 0,01 mg Kupfersulfat dagegen umgekehrt mehr im Zusammenwirken mit 10 mg Ferro- und 1 mg Mangansulfat als mit 1 mg Ferro- und 10 mg Mangansulfat je 100 cm³. Es hat also den Anschein, als wäre bei beiden Organismengruppen ein physiologischer Antagonismus zwischen Mangan und Kupfer besonders wirksam. Ähnliches hat MEIKLEJOHN (1953) für nitrifizierende Bakterien festgestellt. Das Optimum in der Zusammensetzung des Nährsubstrats wird also nicht allein von der absoluten Konzentrationshöhe der einzelnen Elemente bestimmt, sondern ebenso vom Verhältnis zwischen den Einzelkonzentrationen.

Im Mittel kann die Kombination von 0,002 % Calciumchlorid, 0,005 % Ferrosulfat, 0,001 % Mangansulfat und 0,00005 % Kupfersulfat als optimale Spurenelementkombination für die Cellulosezersetzung durch Cellvibrionen und Cytophagen angesehen werden. Mit Rücksicht hierauf und auf die Feststellung, daß die Cytophagen schwach saure Böden als natürliche Standorte bevorzugen, wurde zu ihrer Anreicherung und Isolierung weiterhin ein Agar folgender Zusammensetzung verwendet: H₂O 100; NaNO₃ 0,2; KH₂PO₄ 0,06; K₂HPO₄ 0,03; MgSO₄ · 7 H₂O 0,05; FeSO₄ · 7 H₂O 0,005; CaCl₂ 0,002; MnSO₄ · H₂O 0,001; Agar 1,0. Auch bei allen im folgenden erwähnten Versuchen wurden, wenn nicht ausdrücklich etwas anderes angegeben ist, diese Konzentrationen und vom Kupfersulfat 0,00005 % gegeben. Nicht besonders reine Substrate enthalten von vornherein genügend Kupfer, so daß es in solchen Fällen unberücksichtigt bleiben kann.

Die erwähnten antagonistischen Erscheinungen stehen in engem Zusammenhang mit den biochemischen Funktionen der fraglichen Spurenelemente (FLASCHENTRÄGER u. LEHNARTZ 1951; SCHARRER 1955). Die Rolle des Eisens als Bestandteil des WARBURGSchen Atmungsfermentes ist bekannt und von allgemeiner Bedeutung. Ähnliches ließe sich vom Kupfer als spezifischem Katalysatorelement in der prosthetischen Gruppe der Polyphenoloxidasen sagen. Es ist für die biologische Entstehung dunkler Farbstoffe unentbehrlich und dürfte auch an der Farbstoffbildung der Cellvibrionen und Cytophagen beteiligt sein. Ebenso soll Mangan in manchen oxydierenden Fermenten eine Rolle spielen, z. B. soll es auch die Reoxydation des reduzierten Eisens in den Cytochromen katalysieren. Seine Bedeutung im Eiweißstoffwechsel kommt u. a. darin zum Ausdruck, daß die Aminopeptidase ein Mangan-Proteid ist (FLASCHENTRÄGER u. LEHNARTZ 1951).

Im Gegensatz zu diesen Schwermetallen als funktionellen Bestandteilen oxydierender Fermente scheint Calcium in hydrolytischen Stoffwechsel-

prozessen eine bedeutende Rolle zu spielen. Es hat sich ja auch als Antagonist zu jenen erwiesen. EADES u. WOMACK (1953) haben einen solchen Antagonismus zwischen Calcium und Mangan bei der Säurebildung durch *Lactobacillus casei* gefunden. In Abwesenheit von Calcium wird Fett nur unvollständig aufgespalten (LANG 1952), und Calcium aktiviert die Acetylcholinesterase sowie Adenosintriphosphatase, die durch Kupferspuren gehemmt wird (FLASCHENTRÄGER u. LEHNARTZ 1951). Man könnte versucht sein, anzunehmen, daß das für viele Bakterien und niedere Pilze weithin belanglos erscheinende Element Calcium irgendwie am Celluloseabbau unmittelbar beteiligt sei, zumal auch so intensiv cellulosezersetzende Pilze wie *Chaetomium*-Arten Calcium benötigen. Aber ganz andere Mikroorganismen wie *Saprolegnia*- (REISCHER 1951) und *Phycomyces*-Arten (ØDEGÅRDH 1952) sowie *Azotobacter*, *Nitrosomonas* und Knöllchenbakterien (RIPPEL-BALDES 1955) brauchen ebenfalls Calcium. Möglicherweise ist es hier im Eiweißstoffwechsel als Fermentkatalysator eingesetzt; denn *Bacillus megaterium* braucht Calcium nur, wenn er mit Proteinen anstatt mit niedermolekularen Stickstoffverbindungen ernährt wird (STOKES 1952). Vielleicht spielt also Calcium unter anderem die Rolle eines Aktivators oder Bestandteils von Fermenten, die höher- und hochmolekulare Verbindungen wie Eiweiß, Fette, Cellulose und andere hydrolytisch aufspalten.

Daß dieses Spurenelement hier bei *Cellvibrionen* und *Cytophagen* nicht wie in manchen anderen Fällen nur eine physiologisch nebensächliche Rolle wie beispielsweise eines Magnesiumantagonisten oder eines Exkretstoffbinders oder Entquellungsfaktors (RIPPEL-BALDES 1955) oder dergleichen versieht, geht wohl auch daraus hervor, daß es stets nur in Spuren benötigt wird und nicht durch Barium oder Strontium vertretbar ist. In dem in Abb. 6 dargestellten Versuch beruht die geringe fördernde Wirkung des im Gegensatz zu den beiden anderen verwendeten Chloriden unreinen Strontiumchlorids auf seinem durch Flammenfärbung nachgewiesenen Gehalt an Calcium. Der Versuch wurde in ähnlicher Weise wie der zu Abb. 5 gehörende durchgeführt unter Benutzung der Grundnährlösung mit Eisen und Mangan sowie den Differenzgaben von je 0,002% Calciumchlorid, Bariumchlorid oder Strontiumchlorid. Die Versuchszeit war verhältnismäßig kurz und dementsprechend auch der Celluloseabbau

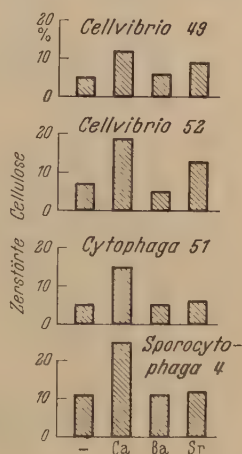


Abb. 6. Vergleich zwischen den Wirkungen von Calcium, Barium und Strontium auf die Cellulosezersetzung von *Cellvibrio*, *Cytophaga* und *Sporocytophaga*. 12.—17. 2. 1953

gering. Aber die Calciumwirkung tritt doch deutlich hervor, und auf Grund der Färbung und des Zerfalls der Filter hat überhaupt nur mit Calciumchlorid und sehr schwach auch noch mit Strontiumchlorid eine Entwicklung und Cellulosezersetzung stattgefunden. Die Celluloseverluste in den Kontroll- und Bariumkulturen sind wahrscheinlich nur durch die Art der Aufarbeitung methodisch bedingte Scheinwerte. Aus dem Versuchsergebnis läßt sich außerdem ableiten, daß die Cytophagen im Ver-

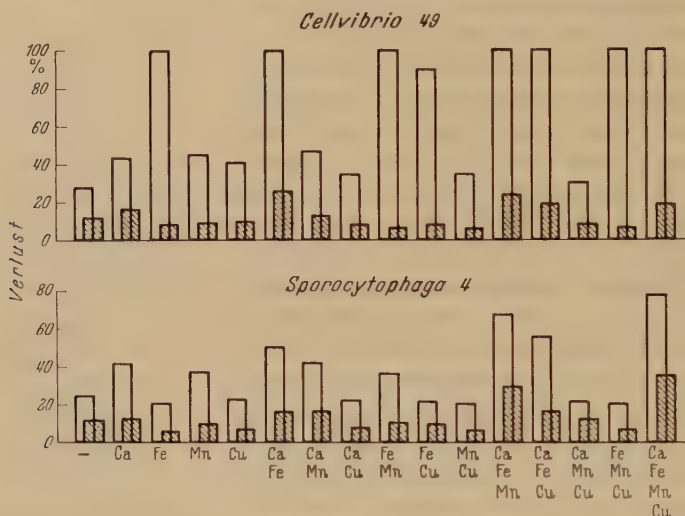


Abb. 7. Die Bedeutung einiger Spurenelemente für die Cellulose- und Glucosezersetzung durch *Cellvibrio* und *Sporocytophaga*. 27. 11.—5. 12. 1952. Offene Säulen: Glucose, schraffierte Säulen: Cellulose

gleich mit den *Cellvibrionen* im allgemeinen nicht nur mehr von den Schwermetallen benötigen, sondern auch mehr Calcium. Denn nur die *Vibrionen* reagierten schon auf die Calciumspuren im Strontiumsalz.

Im Zusammenhang mit der Frage nach den Funktionen des Calciums ist es außerdem bemerkenswert, daß beide *Cellvibrio*-Arten, allerdings nur diese und nicht die *Cytophagen*, Calcium zeitweilig in viel geringeren Spuren oder überhaupt nicht benötigten, wenn sie mit Glucose anstatt mit Cellulose ernährt wurden.

Diese veränderte Kohlenstoffernährung fand unter sonst gleichen Bedingungen statt wie in den vorausgegangenen Versuchen, also mit Grundnährlösung und 0,5% Glucose sowie Differenzgaben von 0,002% Calciumchlorid, 0,005% Ferrosulfat, 0,001% Mangansulfat und 0,00005% Kupfersulfat oder einer der möglichen Kombinationen dieser Spurenelemente. Die Mineralsalzlösung wurde in doppelter Konzentration angesetzt und ebenso wie die doppelt konzentrierte Glucoselösung getrennt von dieser 20 min im Autoklaven bei 120°C sterilisiert. Manchmal wurde die Glucoselösung auch keimfrei filtriert. Danach erst wurden beide Lösungen vereinigt, um so die Entstehung giftiger Substanzen aus der Glucose zu vermeiden (STANIER 1942a, b).

In solchen Lösungen zeigten die Vibrionen mit deutlicher Reaktion zunächst nur Eisenbedürftigkeit, besonders Stamm 49, weniger Stamm 52 (Abb. 7 und Abb. 8, 5.—13. 2. 1953). Calcium schien demnach für *Cellvibrionen* tatsächlich nur bei Ernährung mit Cellulose von

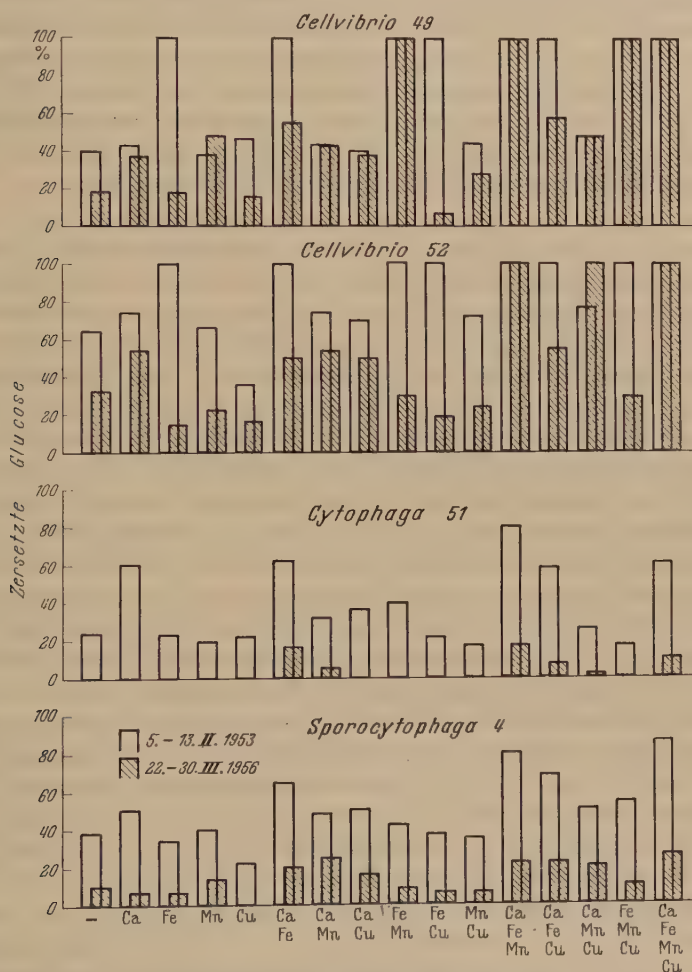


Abb. 8. Die Bedeutung einiger Spurenelemente für die Glucosezersetzung durch *Cellvibrio*, *Cytophaga* und *Sporocytophaga* zu verschiedenen Zeiten

Bedeutung zu sein und auch dann noch nicht, wie weiter oben gezeigt werden konnte, von derjenigen Bedeutung, die es für *Cytophagen* hat. Aus den Ergebnissen des Versuchs vom 5.—13. 2. 1953 wäre außerdem noch hervorzuheben, daß der farblose *Vibrio*-Stamm 49 durch alleinige Gaben von Kupfer leicht gefördert und von Mangan leicht gehemmt

wurde, der gelbbraune Stamm 52 dagegen von Kupfer gehemmt und von Mangan gefördert. Hier äußern sich wieder die verschiedenen Optima im Verhältnis von Kupfer zu Mangan. Möglicherweise wird Kupfer die Oxydation und damit die Entgiftung von Phenolen katalysieren, die durch katalytische Wirkung des Mangans im Eiweißstoffwechsel entstehen. Ganz anders als die *Cellvibrien* verhielten sich die Cytophagen, nämlich grundsätzlich ebenso wie bei Ernährung mit Cellulose. Ihre Entwicklung und ihr Glucoseverbrauch wurden nicht anders als ihr Celluloseverbrauch durch Calcium wie durch Eisen und Mangan gefördert und bei *Sporocytophaga* 4 außerdem wieder durch eine zusätzliche Kupfergabe. Ganz entsprechend verhielt sich vom 21.—31. 10. 1953 *Sporocytophaga* 3.

Dieses Ergebnis ist jedoch ebenso wie die anderen bisher genannten Versuchsergebnisse nicht immer genau reproduzierbar. Schon die Versuche mit Cellulose als Energiequelle fielen nicht immer ganz gleich aus, wenn auch die Unterschiede allgemein mehr gradueller Art waren und sich die Optima der Spurenelementkombinationen meistens nicht verschoben haben. Immerhin hat beispielsweise die sonst sehr manganbedürftige *Cytophaga* 51 in Cellulosekulturen vom 19.—26. 10. 1953 nicht auf Mangan reagiert. Noch viel unbeständiger hinsichtlich der Spurenelementwirkungen erwiesen sich aber die Organismen bei Ernährung mit Glucose. Das geht z. B. aus folgenden Beobachtungen hervor: *Cellvibrio* 49 hat vom 22.—26. 3. 1956 mit Calcium, Eisen und Mangan 100% Glucose zersetzt, vom 13.—18. 4. 1956 aber nur 68%. *Cytophaga* 51 und *Sporocytophaga* 4 haben vom 28. 5.—4. 6. 1953 Cellulose in gewohnter Weise ohne Mangan fast gar nicht angegriffen, mit Mangan aber sehr stark zersetzt. Im Gegensatz zur bisherigen Erfahrung wurde jedoch gleichzeitig der Glucoseverbrauch beider Stämme von 40 bzw. 60% nicht im mindesten durch Mangan gefördert. Was die Calciumwirkung betrifft, so konnte im Gegensatz zu den Versuchsergebnissen in Abb. 7 und 8 vom 18.—21. 5. 1953 der Glucoseverbrauch durch *Cellvibrio* 49 von 32% ohne Calcium auf 88% mit Calcium und in der Zeit vom 28. 5.—4. 6. 1953 durch *Sporocytophaga* 4 von 21% ohne Calcium auf 75% mit Calcium gesteigert werden.

Die Frage nach den Ursachen für diese spontanen Änderungen im Verhalten der Organismen soll hier nicht, sondern in einer späteren Mitteilung untersucht werden. Jedoch sei darauf hingewiesen, daß sie auch experimentell hervorgerufen werden konnten durch Zusatz reduzierender Substanzen zum Wasser, in dem danach die Nährstoffe gelöst wurden. Diese Wirkung wurde zunächst bei den Cytophagen festgestellt. Sie haben sich während längerer Zeiten überhaupt nicht oder nur jeweils in einigen von mehreren Parallelkulturen in glucosehaltigen Nährlösungen entwickeln können. Das geschah, wie ausdrücklich betont sei, obwohl die Glucose immer allein sterilisiert oder filtriert wurde. 1953/54 war es dann

vorübergehend nur möglich, diese Organismen in glucosehaltigem Substrat zu züchten, wenn in dem dazu verwendeten Wasser zuerst 0,01 % Glutathion gelöst worden waren. Später führte diese Methode nicht mehr zum Ziel, sondern statt Glutathion mußte Natriumsulfit gegeben werden, wenn eine Entwicklung stattfinden sollte. Aber auch die Erfolge dieses Verfahrens waren nicht von Dauer, so daß eine abermalige Änderung vorgenommen werden mußte. Zur Zeit (April/Mai 1956) gelingt es nur dann, die Cytophagen in Glucose-Nährlösung in kurzer Zeit und in allen Parallelansätzen zur Entwicklung zu bringen, wenn dem Wasser der Nährlösung zuerst 0,001 % Ascorbinsäure zugesetzt wird und die Lösung außerdem in höherer Schicht (40 cm³ statt wie bisher 20 cm³ in 100 cm³ fassenden Erlenmeyer-Kolben) verwendet wird.

Im Wiederholungsversuch der Abb. 8 vom 22.—30. 3. 1956 war die Gesamtentwicklung aller 4 Organismen geringer als in dem Vergleichsversuch von 1953, und bei den *Cellvibrio*-Arten ist auch das Optimum von Eisen nach Eisen und Mangan bzw. nach Calcium, Eisen und Mangan verschoben. Diese Änderungen müssen jedoch nicht unbedingt auf eine Wirkung der Ascorbinsäure zurückgeführt werden. Denn in Parallelansätzen mit und ohne Zugabe dieses Reduktionsmittels ließ sich ein wesentlicher Einfluß desselben auf den Glucoseverbrauch durch Zellvibrionen bei verschiedenen Spurenelementkombinationen nicht feststellen. Zwar lagen die Werte für die Lösungen mit Ascorbinsäure etwas höher oder niedriger als diejenigen für ascorbinsäurefreie Lösungen, aber die Optima wurden doch nicht oder kaum auf andere Spurenelementkombinationen verlagert. Zu einer anderen Zeit und bei Verwendung eines anderen Reduktionsmittels, nämlich Natriumsulfit, war das jedoch der Fall (Abb. 9). Unter diesen veränderten Verhältnissen trat die Bedeutung des Calciums ganz klar in den Vordergrund. Das Optimum für *Cellvibrio* 52 war sogar schon mit Calcium allein erreicht und für *Cellvibrio* 49 mit Calcium und Eisen. Gleichzeitig in die gleichen Lösungen geimpfte *Cytophaga* 51 und *Sporocytophaga* 4 haben sich wie auch sonst des öfteren nicht entwickelt. Auch in diesem Fall muß das veränderte Verhalten der Bakterien nicht ausschließlich oder in erster Linie durch das Sulfit hervorgerufen sein, wie die oben erwähnten Versuchsergebnisse vom 18. bis 21. 5. 1953 und vom 28. 5.—4. 6. 1953 beweisen. Es ist in diesem Zusammenhang bemerkenswert, daß QUISPEL (RIPPEL-BALDES 1955) *Azotobacter* bei erniedrigtem Redoxpotential züchten konnte, wenn er ihm Calcium gab.

Im Hinblick einerseits auf die Rolle des Calciums als Aktivator mancher Hydrolasen und andererseits des Eisens und Kupfers als Bestandteil oxydierender Fermente kann aus den bisherigen Untersuchungsergebnissen in Übereinstimmung mit der Auffassung von FÄHRAEUS (1944 1946, 1947) und anderen geschlossen werden, daß Zellvibrionen und

Cytophagen die Cellulose hydrolytisch spalten und daß die Spaltprodukte zum Teil glykolytisch und zum Teil oxydativ weiter abgebaut werden. Dafür spricht die dominierende Rolle des Calciums bei der Zersetzung von Cellulose und unter Umständen auch von Glucose. Im Gegensatz zur Cellulose kann Glucose durch Cellvibrionen vermutlich manchmal, nicht immer, aerob veratmet werden, nämlich dann, wenn die Bakterien fast nur eisen-, kupfer- und manganbedürftig sind. Muß ihnen dagegen auch

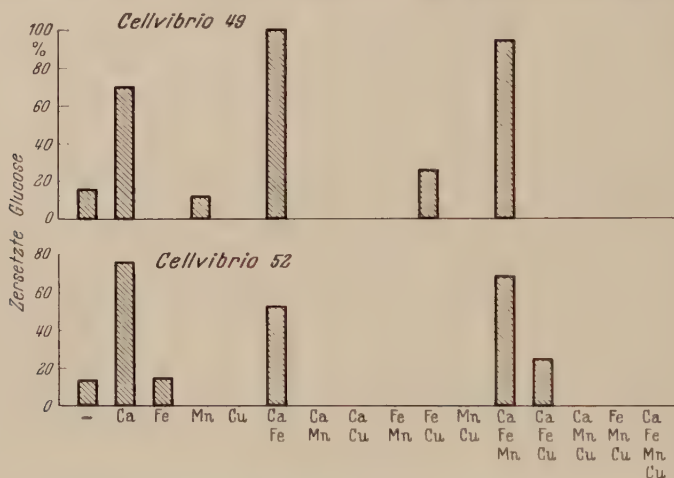


Abb. 9. Die Bedeutung einiger Spurenelemente für die Glucosezersetzung durch *Cellvibrio* bei Gegenwart von 0,015% Natriumsulfat. 8.—15. 6. 1955

bei Glucoseernährung vor allem Calcium geboten werden, was zeitweilig der Fall ist, dann werden sie den Zucker wahrscheinlich mehr glykolytisch abbauen. Die Cytophagen scheinen im Zuckerstoffwechsel beständiger zu sein, insofern sie dabei entsprechend ihrer stets größeren Calciumbedürftigkeit auch stets mehr hydrolytisch arbeiten oder den Zucker unter entsprechenden Umständen überhaupt nicht angreifen. In diesem letzteren Falle kann oftmals, nicht immer, die Entwicklung durch geeignete Zugabe reduzierender Substanzen zum Substrat ermöglicht werden.

Wenn auch anzunehmen ist, daß Mangan im Eiweißstoffwechsel der Cellvibrionen und Cytophagen ebenso wie bei höheren Organismen eine Rolle spielen wird, so ist damit doch noch nicht die auffallend größere Manganbedürftigkeit der Cytophagen gegenüber den Cellvibrionen erklärt. Mangan fördert unter anderem besonders die Sporenbildung von *Bacillus*-Arten (WEINBERG 1955), dürfte also wohl an Atmungsvorgängen besonders wirksam beteiligt sein. Das ist auch anderen Beobachtungen an höheren Organismen zu entnehmen (SCHARRER 1955). Es wäre also

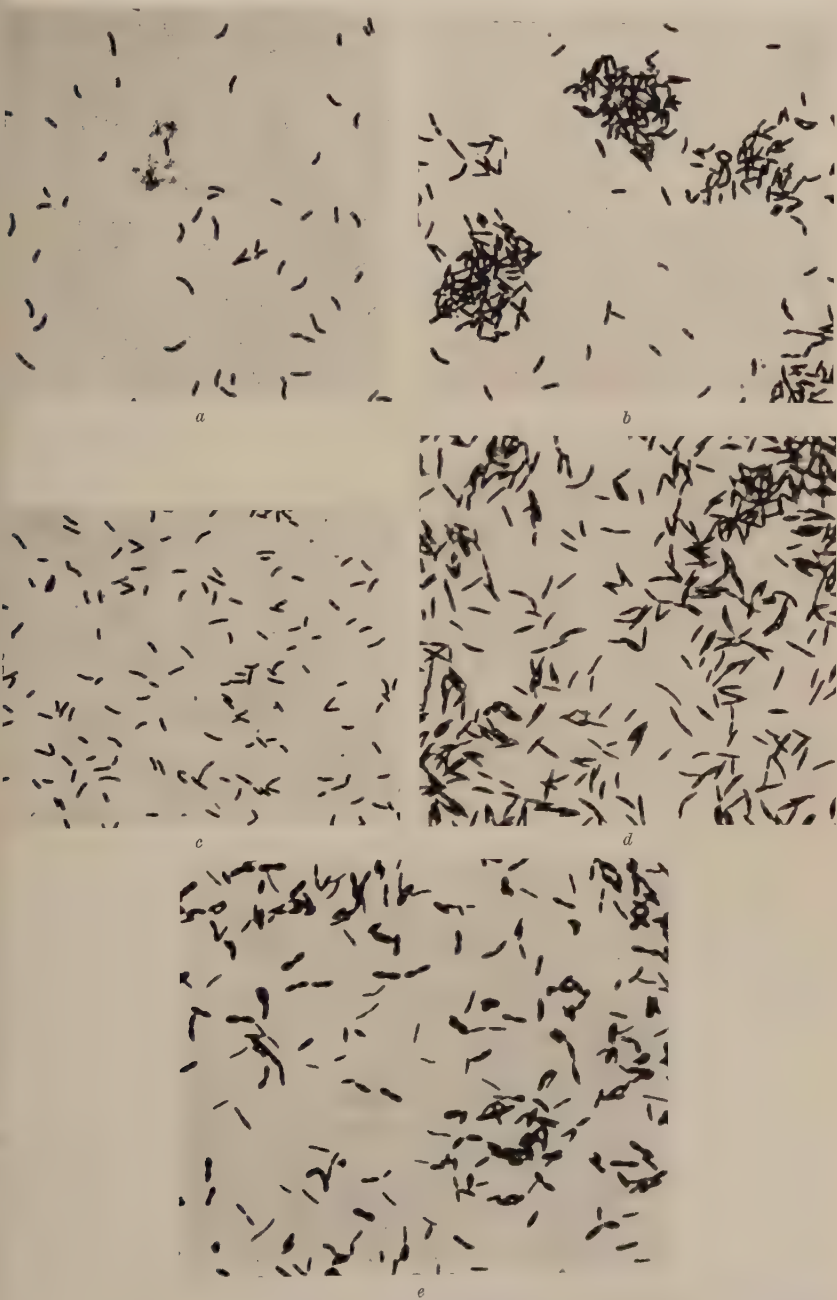


Abb. 10. *Cellvibrio 52* in Grundnährlösung. *a* mit Cellulose ohne Spurenelementgabe; *b* mit Glucose ohne Spurenelementgabe; *c* mit Cellulose, Calcium, Eisen und Mangan; *d* mit Glucose, Calcium, Eisen und Mangan; *e* mit Glucose, Calcium und Eisen. Erythrosin-Gentianaviolett. 1000 :

möglich, daß Mangan bei der Veratmung des eigenen Zelleiweißes, wobei Farbstoffe entstehen können, eine katalytische Funktion ausübt. Diesbezügliche Untersuchungen anderer farbiger und farbloser Cytophagen und Bakterien würden hier vielleicht Klarheit bringen.

Wesentliche Beeinflussungen der Morphologie durch die verschiedenen Kohlenstoffquellen und Spurenelemente ließen sich bei *Cellvibrio* 49 und *Cytophaga* 51 nicht feststellen. Für die Gattung *Sporocytophaga* ist es bereits bekannt, daß sie nur bei Cellulose- und nicht bei Glucose-Ernährung Cysten bildet. Auch sind die Stäbchen einer Glucose-Kultur etwas größer als diejenigen einer Cellulose-Kultur. In beachtlicher Weise reagierte ferner *Cellvibrio* 52 auf die verschiedenen Kohlenstoffquellen und Spurenelementgaben (Abb. 10). Die typische *Vibrio*-Form entwickelte sich nur auf Cellulose (a und c). In Glucose-Lösung waren die Zellen zum Teil stark verdickt (b und e) oder erschienen an den Polen zugespitzt (d). Charakteristisch waren auch die Zellhäufchen (b), die offenbar den Rosettenbildungen bei *Sporocytophaga* entsprechen, in denen anscheinend nach vorübergehender Fusionierung der Stäbchen die Cysten entstehen (STAPP u. BORTELS 1934). Auch in den Glucose-Kulturen von *Cellvibrio* 52 mit Calcium, Eisen und Mangan scheinen die merkwürdig aufgequollenen Zellen in den dichteren Anhäufungen miteinander zu verschmelzen, hier aber nicht polar wie bei *Sporocytophaga*, sondern seitlich (d). Zur endgültigen Klärung dieser Erscheinungen, deren Bedeutung für die Biologie des Bacteriums noch unbekannt ist, sind eingehendere Untersuchungen erforderlich.

Zusammenfassung

In nicht besonders gereinigten synthetischen Nährlösungen mit Cellulose oder Glucose als Kohlenstoffquelle werden von *Cellvibrio*- und *Cytophaga*-Arten Calcium, Eisen, Mangan und zum Teil auch Kupfer als Spurenelemente benötigt, von Cytophagen mehr als von Cellvibrionen. Die Cytophagen sind besonders manganbedürftig. Dementsprechend sind sie mehr in schwach sauren Böden und die Cellvibrionen mehr in schwach alkalischen verbreitet.

Aus physiologischen Antagonismen zwischen den einzelnen Spurenelementen wird auf ihre Rolle im Stoffwechsel geschlossen. Die Funktionen des Calciums scheinen demnach im hydrolytischen und diejenigen des Eisens, Mangans und Kupfers im oxydativen Atmungsstoffwechsel zu liegen. Die überragende Bedeutung des Calciums für die Cellulosezersetzung, besonders durch einige Zellvibrionen, liefert eine Stütze für die Auffassung vom hydrolytischen und nicht oxydativen Abbau der Cellulose.

Mitunter verhalten sich die Organismen abweichend vom Gewohnten. Sie wachsen dann entweder überhaupt nicht oder mit anderen Spurenelementkombinationen. In solchen Fällen konnte die Entwicklung der

Cytophagen in Glucose-Lösung nur durch Zusatz reduzierender Stoffe zur Nährlösung erreicht werden.

Einige der untersuchten Organismen werden durch die verschiedenen Kohlenstoffquellen und Spurenelemente auch morphologisch und biologisch in charakteristischer Weise beeinflusst.

Literatur

BORTELS, H.: Biokatalyse und Reaktionsempfindlichkeit bei niederen und höheren Pflanzen. *Angew. Bot.* **11**, 285—332 (1929); Über den Spurenelementbedarf von Cellvibrionen und Cytophagen. *Zbl. Bakter. I. Orig.* **160**, 213—216 (1953). — BORTELS, H., u. C. WETTER: Fortgeführte mikrobiologische Untersuchungen über die Mikronährstoffe Mangan und Molybdän. *Nachr.bl. dtsh. Pflanzenschutzdienst.* **6**, 2—5 (1954).

CURRAN, H. R., and F. R. EVANS: The influence of iron and manganese upon the formation of spores by mesophilic aerobes in fluid organic media. *J. Bacter.* **67**, 489—497 (1954).

EADES, CH. H., and M. WOMACK: Calcium as a growth stimulant for *Lactobacillus casei*. *J. Bacter.* **65**, 322—325 (1953).

FÄHRAEUS, G.: Wirkung von Glukose auf die Zellulosezersetzung einiger Cytophaga-Arten. *Zbl. Bakter. II*, **104**, 264—269 (1941); Studies in aerobic cellulose decomposition. I. The course of cellulose decomposition by Cytophaga. *The Annals of the Agric. College of Sweden* **12**, 1—22 (1944); Enzyme preparations from cellulose-decomposing bacteria. *Experientia (Basel)* **2**, 1—4 (1946); Studies in the cellulose decomposition by Cytophaga. *Symbolae bot. Upsalienses* **9**, 128 pp. (1947). — FLASCHENTRÄGER, B., u. E. LEHNARTZ: *Physiologische Chemie*. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1951.

HARMSSEN, G. W.: *Onderzoekingen over de aerobe Celluloseontleding in den Grond*. Dissertation 1946, Wageningen/Holland.

JENSEN, H. L.: The microbiology of farmyard manure decomposition in soil. II. Decomposition of cellulose. *J. Agricult. Sci.* **21**, 81—100 (1931).

LANG, K.: *Der intermediäre Stoffwechsel*. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1952.

MEIKLEJOHN, J.: Iron and the nitrifying bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **8**, 58—65 (1953).

ØDEGÅRD, K.: On the physiology of *Phycomyces blakesleeana* Burgeff. I. Mineral requirements on a glucose-asparagine-medium. *Plant. Physiol.* **5**, 583—609 (1952).

REISCHER, H. S.: Growth of *Saprolegniaceae* in synthetic media. I. Inorganic nutrition. *Mycologia (N. Y.)* **43**, 142—155 (1951). — RIPPEL-BALDES, A.: *Grundriß der Mikrobiologie*. 3. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.

SCHARRER, K.: *Biochemie der Spurenelemente*. 3., vollständig Neubearb. Aufl., Berlin und Hamburg: Paul Parey 1955. — SIJPESTEIJN, A. K., and G. FÄHRAEUS: Adaptation of *Sporocytophaga myxococcoides* to sugars. *J. Gen. Microbiol.* **3**, 224—235 (1949). — SPEYER, E.: Untersuchungen an *Sporocytophaga myxococcoides* (STANIER 1940). *Arch. Mikrobiol.* **18**, 245—272 (1953). — STANIER, R. Y.: The Cytophaga-group: A contribution to the biology of Myxobacteria. *Bacter. Rev.* **6**, 143—196 (1942a); Are there obligate cellulose-decomposing bacteria? *Soil Sci.* **53**, 479—480 (1942b). — STAPP, C., u. H. BORTELS: Mikrobiologische Untersuchungen über die Zersetzung von Waldstreu. I. Mittlg. *Zbl. Bakter. II*, **90**, 28—66 (1934). — STOKES, J. L.: Nutrition of microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.* **6**, 29—48 (1952).

WEINBERG, E. D.: The effect of Mn^{++} and antimicrobial drugs on sporulation of *Bacillus subtilis* in nutrient broth. *J. Bacter.* **70**, 289—296 (1955).

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen)

Über den Einfluß verschiedener Stoffe auf die Aktivität von Antibioticis gegenüber Mycobakterien*

Von

GERTRAUDE BOCK

Mit 13 Textabbildungen

(Eingegangen am 9. Juli 1956)

Die zu den *Actinomycetales* gehörenden *Mycobacteriaceae* besitzen gegenüber Antibioticis eine gewisse Resistenz, die nach FRANKE u. SCHILLINGER (1944), ebenso wie auch ihre Säurefestigkeit (ANDERSON 1939), wahrscheinlich auf dem hohen Lipoidgehalt (Wachs) beruht, der den Stoffaustausch zwischen Zelle und Medium vermindert.

LEMBKE u. RUSKA (1940) zeigten elektronenmikroskopisch, daß bei *Mycobact. tuberculosis* keine Hüllsubstanz (Lipoidkapsel), sondern eine Grenzschicht vorhanden ist, die mit lipophilen Gruppen besetzt ist und mit dem plasmatischen Geschehen verhaftet zu sein scheint (Zellmembran). Sie besteht nach KNAYSI (1946) aus Lipoiden und Proteinen.

Schon BERGEL (1918) stellte fest, daß vor der Vernichtung des *Mycobact. tuberculosis* im Organismus die säurefeste Fettsubstanz, damals als Fetthülle bezeichnet, entfernt wird. KRAUT u. BURGER (1939) konnten aus Tuberkelfett drei Hauptfraktionen extrahieren, deren acetonlösliche Fettfraktion durch Pankreaslipase zu 30—40% in zwei Tagen gespalten wurde.

Die Säurefestigkeit der Mycobakterien geht bei Zusatz von Pankreaslipase verloren (SARTORY u. Mitarb. 1947 a, b; VESCOVI 1947; PRINA 1952, 1953), ebenso auch bei Streptomycinzusatz (SMITH u. WAKSMAN 1947; PRINA 1953); gleichzeitig treten morphologische Veränderungen auf.

Extrakte aus Larven der Wachsmotte *Galleria melonella* wirken nach MANKIEWICZ (1952) auf *Mycobact. tuberculosis* lipolytisch und vermindern die Säurefestigkeit und Virulenz. RADETZKI (1948) fand bei Mischkultur von *Mycobact. tuberculosis* mit *Aspergillus niger* nach einigen Tagen keine Mycobakterien mehr. Im getrockneten *Aspergillus*-Mycel waren Neutralfette angereichert, und es ließ sich ein fettspaltendes Ferment nachweisen.

Die genannten Untersuchungen führten zu der Frage, ob und wie weit durch Zusatz von Substanzen wie Pankreaslipase die Aktivität von Antibioticis und Chemotherapeuticis gegenüber Mycobakterien beeinflußt werden kann. Diese Frage wurde in Reagensglasversuchen, mikroskopischen und färbereichen Untersuchungen und durch Atmungsmessungen geprüft. Zum Vergleich wurden „normale“ Bakterien herangezogen.

* Auszug aus der gleichnamigen Dissertation der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Göttingen (1955).

Außerdem sollten die Versuche das unterschiedliche Verhalten von saprophytischen und pathogenen Mycobakterien zeigen, die nicht nur in ihrem Lipoidgehalt (ANDERSON 1931) differieren, sondern auch in ihrem Stoffwechsel (FRANKE u. SCHILLINGER 1944; GALE 1952) und in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Antibioticis (BUREACZEWSKY 1936). Ferner wurde im Reagensglas und in der Warburg-Apparatur untersucht, ob ein Zusatz überoptimaler Konzentrationen von Neutralsalzen, welche die Bakterienzelle morphologisch verändern (PÈJU u. RAJAT 1909; HEINZEL 1950; Voss 1952), die Antibiotica-Aktivität beeinflusst.

Methodik

1. Bakterienkulturen. Für die Untersuchungen wurden folgende Mycobakterien-Stämme verwendet: a) *Mycobact. lacticola*, b) *Mycobact. phlei*, die beide der Institutssammlung entnommen wurden, c) *Mycobact. tuberculosis*¹, Typus *humanus*, Nr. 809/12 (1) und Nr. 1479 (2) und d) *Mycobact. tuberculosis*, Typus *gallinaceus*.

Die Saprophyten wurden auf Pepton-Agar (1% Fleischextrakt, 1% Pepton, 0,5% Kochsalz, 3% Agar, pH 7,2) kultiviert und alle vier Wochen auf frischen Nährboden überimpft; Bebrütung 48 Std bei 37° C. Der *Mycobact. lacticola*-Stamm zeigte ein rauhes, gefaltetes Wachstum auf dem oben angegebenen Medium, war demnach als „*perrugosum*“ oder „*rough*“ zu bezeichnen, während der *Mycobact. phlei*-Stamm glatt wuchs, also der Gruppe „*planum*“, „*smooth*“, zuzuordnen war. Die Farbstoffbildung war bei *Mycobact. lacticola* gering. Die Kulturen sahen hellgelb aus; bei *Mycobact. phlei* beobachtete man zuerst ein Ockergelb, das später in ein Rot überging.

Mycobact. tuberculosis, Typus *humanus* und Typus *gallinaceus*, wurden auf Eiernährböden, Substrat 4 nach HOHN (1939/1940), drei Wochen bei 37° C bebrütet und dann im Eisraum aufbewahrt. Die *Mycobact. tuberculosis*-Stämme wuchsen rosettenförmig, hatten wachsartige Konsistenz und weißes bis gelbliches Aussehen.

2. Nährlösungen und Beimpfung. Die Nährlösung für die Saprophyten nach JENSEN (1934), auch von v. PLOTHO (1942) als günstiges Substrat, bei größter Ausbeute an Trockensubstanz, erwähnt, enthält: 1% Glucose, 0,1% Asparagin, 0,1% K₂HPO₄, 0,05% MgSO₄, 0,05% NaCl und 0,02% (NH₄)₂HPO₄, pH 7,2. Die Sterilisation erfolgte für 15 min bei 110° C.

Für die pathogenen Mycobakterien diente die Nährlösung nach GOEBEL, Substrat 30. Zusammensetzung der Nährlösung: 4,5 g Na₂HPO₄, 1 g KH₂PO₄, 0,6 g MgSO₄, 3,0 g Na-Citrat, 5,0 g NH₄Cl und 1 ml einer 0,01%igen wäßrigen Ferriammoniumsulfatlösung, 20 ml Glycerin ad 1000 ml H₂O; auf 90 ml Nährlösung 10 ml Rinderserum (inaktiviert). Die Nährlösung wurde fraktioniert im strömenden Dampf an drei aufeinanderfolgenden Tagen sterilisiert. — Von einer Schrägagarkultur wurden wenige Kolonien in ein Röhrchen mit 5 ml Nährlösung steril überimpft. Bei den saprophytischen Mycobakterien betrug die Bebrütungszeit 48 Std, bei den pathogenen Stämmen 18—21 Tage bei 37° C. Die Einsaat für die Versuchsserien war stets 0,05 ml Bakteriensuspension/ml Nährlösung. Die Kulturen wurden auf der Schüttelmaschine geschüttelt, um ein diffuses Wachstum zu erreichen.

¹ Die Stämme von *Mycobact. tuberculosis*, Typus *humanus*, wurden freundlicherweise vom Hygienischen Institut der Universität Göttingen, der Stamm Typus *gallinaceus* von der Tierärztlichen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt.

3. Quantitative Bestimmung der Bakterientrockensubstanz und der Bakterienzahl. Im Laufe der Untersuchungen war es sehr wichtig, Einsaat und Ertrag der Bakterien quantitativ durch Trockensubstanzbestimmung zu ermitteln. Die Trübungsmessung mit dem Universalcolorimeter nach LANGE erwies sich als geeignet. Zur Bestimmung der Trockensubstanz wurden die Bakterien zentrifugiert, gewaschen und bei 95°C im Vakuumtrockenschrank getrocknet. Die Eichkurven ergaben, in Übereinstimmung mit RADLER (1955), eine lineare Abhängigkeit der Extinktionswerte von dem Gehalt an Bakterientrockensubstanz bis zu ungefähr 1 mg je Milliliter.

Die quantitativen Bakterienbestimmungen beschränkten sich auf die saprophytischen Stämme, da bei den pathogenen Keimen nur durch den Zusatz oberflächenaktiver Substanzen, wie z. B. „Tween 80“, ein Polyoxyäthylenderivat des Sorbitanmonooleates (DUBOS 1946), ein diffuses Wachstum hervorgerufen wird, wie es für Trübungsmessungen erforderlich ist. „Tween 80“ konnte jedoch nicht verwendet werden, was später (S. 270) erklärt wird. — In einer Thoma-Zählkammer (1 μ l in 400 Quadrate geteilt) wurden parallel zur Trockensubstanzbestimmung die Bakterien gezählt, so daß alle Trockengewichte auf die Bakterienzahl umgerechnet werden konnten.

4. Herstellung der Substanzlösungen. Die Antibiotica¹ Na-Penicillin-sulfat, Dihydrostreptomycinsulfat und die Chemotherapeutica p-Aminosalicylsäure (Na-Salz), Isonicotinsäurehydrazid wurden steril eingewogen und gelöst. Die Fermente Lipase (Fa. Schuchardt) und Trypsin (Fa. Novo) wurden eingewogen und steril filtriert. Das Lipasetrockenpräparat ist ein Pankreaskonzentrat, das neben der Lipase noch Ballaststoffe enthält, so daß es schwer löslich ist. Deshalb war eine Druckfiltration (SEITZ) unumgänglich. Da hierdurch die Ausbeute an Lipase wegen der Adsorption im Filter verringert wurde, mußte die Lipase bereits in der Nährlösung bzw. im Puffer gelöst werden. Von den Neutralsalzen LiCl, NaCl und MgCl₂ wurden 5 molare, von CaCl₂ und BaCl₂ 2,5 molare Stammlösungen hergestellt, sterilisiert und vor Versuchsbeginn in entsprechenden Konzentrationen der Nährlösung zugesetzt.

5. Aktivitätsbestimmungen der Fermente. Die Enzyme mußten zunächst auf ihre Wirksamkeit geprüft werden. Internationale Ferment-Einheiten gibt es noch nicht. Ganz allgemein versteht man unter einer Enzym-Einheit die Menge an Ferment, die unter ganz bestimmten Bedingungen bei optimalem pH und optimaler Temperatur einen bestimmten Substratumsatz bewirkt.

Zur Lipase-Bestimmung wurde die Olivenölspaltung nach WILLSTÄTTER u. Mitarb., modifiziert von VOGEL u. LAEVERENZ (1935), angewendet. Das Substrat ist Olivenöl, das durch die Lipase in Glycerin und Fettsäuren gespalten wird. Die Spaltung wird gemessen an der Zunahme der freien Carboxylgruppen durch alkoholische Titration. Die Pankreaslipase „Schuchardt“ hatte ungefähr eine Aktivität von 0,75 Lipase-Einheiten/ml. Vor jedem Versuch wurde die Aktivität bestimmt. Die Lipaselösung muß stets frisch angesetzt werden, da Lipase in wäßriger Lösung sehr instabil ist.

Neben dem colorimetrischen Trypsin-Test nach ABDERHALDEN (1945) erwies sich die Trypsin-Bestimmung nach SPEYER (1953), die auf der Agar-Diffusionsmethode beruht, als geeignet. Das Trypsin „Novo“ besitzt eine Aktivität von ungefähr 1 E/1,1 mg (nach DIRR 1942). Das benutzte Pankreas-Konzentrat „Schuchardt“ enthält, sowohl nach der colorimetrischen Methode als auch nach der Diffusionsmethode, noch eine Aktivität von 3 Trypsin-Einheiten/ml filtrierter Lipase. Nach

¹ Mein besonderer Dank gilt der Penicillin-Gesellschaft Dauelsberg u. Co., Göttingen, für die Überlassung der Substanzen und für die Förderung meiner Arbeit.

der Original-WILLSTÄTTER- u. WALDSCHMITZ-LEITZ-Methode (1926), die sich in Reaktionstemperatur und Reaktionsmenge von der erstgenannten Bestimmung unterscheidet, würde sich bei „Novo“ eine Trypsin-Aktivität von ungefähr 180 E/g, bei dem Pankreaskonzentrat von etwa 0,6 E/ml filtrierter Lipase ergeben. Das Umrechnungsverhältnis beträgt 1 : 5.

6. Technik der Gasstoffwechselmessungen. Die von WARBURG (1926) entwickelte manometrische Methode, die von HIRSCH (1936 und 1937) und kürzlich auch von CLAUS (1956) zur quantitativen Messung des Bakterienstoffwechsels benutzt wurde, kann zur Beurteilung der Wirkung antibakterieller Substanzen herangezogen werden (SCHULER 1946; HIRSCH 1947). Es wurde die WARBURG-Apparatur der Fa. Braun, Melsungen, verwendet. Die Warburg-Gefäße wurden mit 1,9 bis 2,0 ml Bakteriensuspension nach quantitativer Bestimmung der Bakterienzahl und die Anhangsbirnen mit 0,1 ml Substanzlösung gefüllt. Bei dieser Schichtdicke war eine optimale Sättigung des Substrates mit dem überstehenden Gas gewährleistet. 0,3 ml einer 20%igen KOH-Lösung dienten als CO₂ absorbierendes Agens. Die Gasphase war Luft. Nach 15 min konnten die Manometerhähne geschlossen werden, da die Temperaturdifferenz der Gefäße von Zimmertemperatur zu 37°C in dieser Zeit ausgeglichen war. Die Ablesung des Sauerstoffverbrauches erfolgte jeweils nach 30 min. Nach 30 bzw. 60 min wurden die Substanzlösungen (0,1 ml) in die Reaktionsgefäße gekippt. Durch Multiplikation des Sauerstoffverbrauches mit der Gefäßkonstanten des Reaktionsgefäßes unter Berücksichtigung des Thermobarometers ergibt sich der wirkliche Sauerstoffverbrauch. Weiteres zur Technik dieser Methode ist bei UMBREIT u. Mitarb. (1945) zu finden.

Wachstumsversuche in Anwesenheit von Fermenten, Antibioticis und Chemotherapeuticis

Wachstum und morphologische Veränderungen der Mycobakterien bei Zusatz von Pankreaslipase

Das Wachstum einer Bakterienkultur kann festgelegt werden durch Bestimmung der Bakterienzahl, des Trockengewichtes oder eines Stoffwechselproduktes in gewissen Zeitabständen innerhalb des Wachstumsverlaufes (RIPPEL-BALDES 1955). Die Aufzeichnung der Bakterienzahl oder eines Stoffwechselproduktes in Abhängigkeit von der Zeit ergibt ein charakteristisches Kurvenbild, nämlich eine S-förmige Kurve (MONOD 1942).

Trübungsmessungen im Universalcolorimeter nach LANGE bestätigten dieses Kurvenbild für die saprophytischen Mycobakterien, während nach FISHER u. a. (1951) *Mycobact. tuberculosis* kein ausgesprochen logarithmisches Wachstum zeigt, sondern einen Wachstumsverlauf, der zunächst logarithmisch, dann linear ist. Die Verfasser erklärten dies mit dem langsamen Wachstum von *Mycobact. tuberculosis*. Auch bei den Saprophyten scheint beim Übergang vom exponentiellen Wachstum zur stationären Phase ein lineares Wachstum stattzufinden, das zwischen 48—72 Std liegt. Nach 96 Std war die stationäre Phase erreicht, und die zur Vermehrung erforderlichen Nährstoffe waren erschöpft.

Das verwendete Lipasekonzentrat aus Pankreas wirkte auf die saprophytischen Stämme wachstumsfördernd, während die pathogenen Stämme gehemmt wurden. Erst eine Konzentration von 0,09 Lip.E/ml

ermöglichte ein gutes Wachstum. Wahrscheinlich wird die Wachstumsförderung mit dem hohen Gehalt der Lipaselösung an Trypsin (3 E/ml) und Stickstoff (0,75 Lip. E: Gesamtstickstoff 3,86 mg/ml; davon 0,56 mg/ml auf Eiweißstoffe, einschließlich Lipase und Trypsin als Eiweißkörper; Bestimmung nach KJELDAHL) zusammenhängen. Als Hemmungsfaktor kann andererseits das Enzym-Präparat selbst angesehen werden, weil es eine artfremde Substanz ist; oder aber die hohe Konzentration der Lipase wirkt nach Verlust der Säurefestigkeit schädigend. Eine hemmende Wirkung der Lipase konnte auch RADETZKI (1948) mit *Aspergillus*-Lipase bei *Mycobact. tuberculosis*, Typus *humanus*, nachweisen.

Die Säurefestigkeit, die vom Entwicklungszustand des Bacteriums abhängt, wird heute als eine aktive Leistung des Zellprotoplasten angesehen. Die hochmolekularen Oxysäuren der Wachsfraction, die Mycolsäuren, sind nach ANDERSON (1939) für die Säurefestigkeit verantwortlich. Nach YEGIAN u. VANDERLINDE (1947) spielt die cytoplasmatische Membran mit ihren permeablen Eigenschaften die Hauptrolle. — Es muß erwähnt werden, daß BARTRAM (1950) zeigen konnte, daß zwischen Lipidgehalt und Entfärbungsfähigkeit der Mycobakterien ein Zusammenhang besteht.

Bereits nach dreistündiger Einwirkung von 0,75 Lip.E/ml auf wachsende Kulturen von *Mycobact. lacticola* und *Mycobact. phlei* hatten die Bakterien zum Teil ihre Säurefestigkeit verloren. Nach der ZIEHL-NEESEN-Färbung (JANKE 1946) zeigten die Bakterien die Kontrastfarbe blau. — Obwohl die Mycobakterien mikroskopisch einen starken Pleomorphismus aufweisen, ist ein gewisser Rhythmus der Bakterienzelle erkennbar. Während junge Zellen eine längere Stäbchenform besitzen, gehen ältere Stadien in eine Kurzstäbchenform über. Diese Kurzstäbchen können in Granula zerfallen.

Unter dem Einfluß von Lipase wurden die Bakterien auch morphologisch verändert. Der Bakterienleib war schmaler geworden; nach längerer Einwirkung bis zu 48 Std war ein Zerfall in einzelne Granula zu beobachten; nach Überimpfung wuchs eine solche Kultur wieder zu normal färbbaren Bakterien aus. Auch in alten, nur Granula zeigenden Kulturen war dies der Fall; immerhin kann hier nicht entschieden werden, ob es sich nicht um Kümmerformen handelte. — Daneben zeigten einige Bakterien auch eine Fadenbildung. *Mycobact. tuberculosis* verhielt sich ähnlich; es wurde eine Konzentration von 0,045 Lip.E/ml verwendet.

Ruhende Keime verloren ebenfalls ihre Säurefestigkeit. Mikroskopische Untersuchungen wurden nach 6stündigem Kontakt von Lipase in Puffer mit zentrifugierten und 2mal in NaCl-Lösung gewaschenen Bakterien durchgeführt.

Außerdem zeigte sich ein Verlust der Fluorescenz¹ nach Behandlung mit dem Fluorochrom „Auramin“ (Methode nach HAGEMANN 1937) bei

¹ Herrn Prof. Dr. R. MEYER danke ich für seine Unterstützung bei der Fluorescenzmikroskopie.

allen untersuchten Mycobakterien, die in Gegenwart von Lipase gewachsen waren. Man kann demnach annehmen, daß das Fluorochromierungsvermögen der Mycobakterien von den gleichen Bedingungen abhängig ist wie die Säurefestigkeit.

Die Wirkung von Antibioticis und Chemotherapeuticis auf Mycobakterien

Von der großen Anzahl der Antibiotica und Chemotherapeutica, die im Kampf gegen die Tuberkulose eingesetzt werden, wurden einige wirksame Substanzen zur Testung herangezogen.

1. Antibiotica. a) Penicillin, das nach UMBREIT (1953) bei penicillinsensiblen Bakterien ein frühes Stadium der Ribose-Nucleinsäure-Synthese hemmt, bei Mycobakterien keine Wirkung hat. — b) Streptomycin (DHS), das nach BARKULIS (1953) bei *E. coli* in den Brenztraubensäure-Stoffwechsel eingreift. Die Wirkungsweise des Streptomycins bei Mycobakterien ist noch nicht genau bekannt. FITZGERALD u. BERNHEIM konnten 1947 nachweisen, daß bei einer Reihe saprophytischer und avirulenter Mycobakterien die Oxydation der Benzoesäure durch Streptomycin gehemmt wird.

2. Chemotherapeutica. a) Isonicotinsäurehydrazid (INH), das nach ZELLER (1952) die Diaminoxidase und Guanidin-Desaminase bei *Mycobact. smegmatis* hemmt. HIRSCH stellte 1952 fest, daß Streptomycin und INH sich in ihrer Wirkungsweise unterscheiden, da ein INH-resistenter Stamm von *Mycobact. tuberculosis*, Typus *humanus*, gegenüber Streptomycin empfindlich war. b) p-Aminosalicylsäure (PAS). — Im Verdünnungstest wurde die Konzentration der wirksamen Substanz ermittelt, bei der das erste sichtbare Wachstum zu beobachten war.

Tab. 1 läßt einen deutlichen Unterschied in der Empfindlichkeit der verschiedenen säurefesten Bakterien gegenüber den getesteten Arzneimitteln, besonders bei PAS, erkennen. Während saprophytische Mycobakterien noch

Tabelle 1. Empfindlichkeit der Mycobakterien gegenüber verschiedenen Therapeuticis allein und in Kombination mit Lipase

	Teststamm	Na-Pen. S.		DHS		PAS		INH	
		a) ohne	b) mit	a) ohne	b) mit	a) ohne	b) mit	a) ohne	b) mit
		Lipase		Lipase		Lipase		Lipase	
Saprophyten	<i>Mycobact. lacicola</i>	3300 E	600 E	0,2 γ	—	6,2 mg	1,5 mg	0,012 mg	0,003 mg
	<i>Mycobact. phlei</i>	3,75 E	0,89 E	0,1 γ	—	3,1 mg	1,5 mg	0,4 mg	0,1 mg
Tier- und menschenpathogene Stämme	<i>Mycobact. tuberc.</i> <i>T. gallinaceus</i>	—	—	125 γ	31,5 γ	—	—	62,5 γ	7,8 γ
	<i>Mycobact. tuberc.</i> 1 <i>T. humanus</i>	—	—	62,5 γ	7,8 γ	7,8 γ	0,98 γ	—	—
	<i>Mycobact. tuberc.</i> 2 <i>T. humanus</i>	—	—	7,8 γ	1,56 γ	500 γ	62,5 γ	62,5 γ	15,6 γ

eine Konzentration von 1 mg/ml PAS vertrugen, wuchsen die Stämme von *Mycobact. tuberculosis* nur bis zu einer Konzentration von höchstens 10 γ /ml. Penicillin zeigte sogar eine unterschiedliche Wirkung innerhalb der Saprophyten. *Mycobact. phlei* erwies sich als ziemlich penicillinempfindlich, während *Mycobact. lacticola* gegen Penicillin völlig resistent blieb. Wahrscheinlich beruht dieser Unterschied darauf, daß *Mycobact. phlei* im Gegensatz zu *Mycobact. lacticola* weniger säurefest ist.

Die Wirkung von Lipase und Antibioticis auf Mycobakterien

Wie verhält sich nun das Mycobakterium, wenn Antibioticum und Lipase gemeinsam auf die Zelle einwirken?

Die Testung erfolgte mit abfallenden Antibiotica- bzw. Chemotherapeutica-Konzentrationen in Kombination mit feststehender Lipasekonzentration. Die Lipasekonzentration betrug bei den Saprophyten 0,75 Lipase E/ml, bei den pathogenen Stämmen 0,09 Lipase E/ml.

In Gegenwart von Lipase ist die Empfindlichkeit eines Mycobakteriums gegenüber Antibioticis erhöht, bei *Mycobact. lacticola* stärker als bei *Mycobact. phlei* (Tab. 1). Hierfür dürfte der Verlust der Säurefestigkeit verantwortlich zu machen sein: infolge Veränderung der Bakterienoberfläche vermag das Antibioticum besser in die Zelle einzudringen. — Mikroskopisch waren bei *Mycobact. lacticola* nach Einwirkung von 3300 E Penicillin + 0,75 Lip. E/ml lysierte und aufgequollene Zellen zu beobachten, die sich nach der ZIEHL-NEELSEN-Färbung blau färbten, während die Bakterien in Gegenwart von Penicillin ohne Lipase morphologisch und färberisch nicht verändert waren. Bei 1650 E Pen./ml + 0,75 E Lipase waren ebenfalls morphologische Veränderungen, Vergrößerung der blau gefärbten Einzelzelle und Lyse eingetreten.

Nach Ermittlung der Antibioticakonzentrationen, bei denen ein gutes Wachstum gewährleistet war, wurden diese Antibiotica zusammen mit Lipase den Testbakterien zugesetzt und das Wachstum verfolgt. Abb. 1 gibt einen Einblick in den Wachstumsverlauf. Die Extinktionswerte der Bakterienkulturen wurden alle 6 Std densitometrisch bestimmt.

Mycobact. lacticola wuchs in Gegenwart von Lipase schneller und üppiger als in der Kontrollkultur. Penicillin allein hemmte das Wachstum nur kurze Zeit, die Wachstumskurve verlief parallel zur Kontrolle. PAS allein verursachte schon eine größere Abweichung als Penicillin. Die Kombination Lipase und Penicillin hemmte dagegen die Keimvermehrung deutlich; ebenso auch die Kombination Lipase + PAS. Bei Lip. + 1650 E Pen./ml kam es zu einer vorübergehenden Entwicklungshemmung. Bei *Mycobact. phlei* wurde gleichfalls in Gegenwart von Lipase die Zeit der Generationsverdoppelung verkürzt, die Ausbeute an Bakterientrockensubstanz war größer als in der Kontrollkultur. PAS und Penicillin bewirkten auch bei diesem Stamm zunächst eine kurzfristige Wachstumsverzögerung, doch nach Adaptation an das Chemotherapeuticum

bzw. Antibioticum, verlief das Wachstum parallel zur Kontrollkultur und erreichte die gleiche Zellzahl in gleicher Zeit. In Kombination mit Lipase bewirkten beide Stoffe eine starke Hemmung, die erst nach 72 Std langsam aufgehoben wurde, so daß mit einer Zellvermehrung noch zu rechnen war.

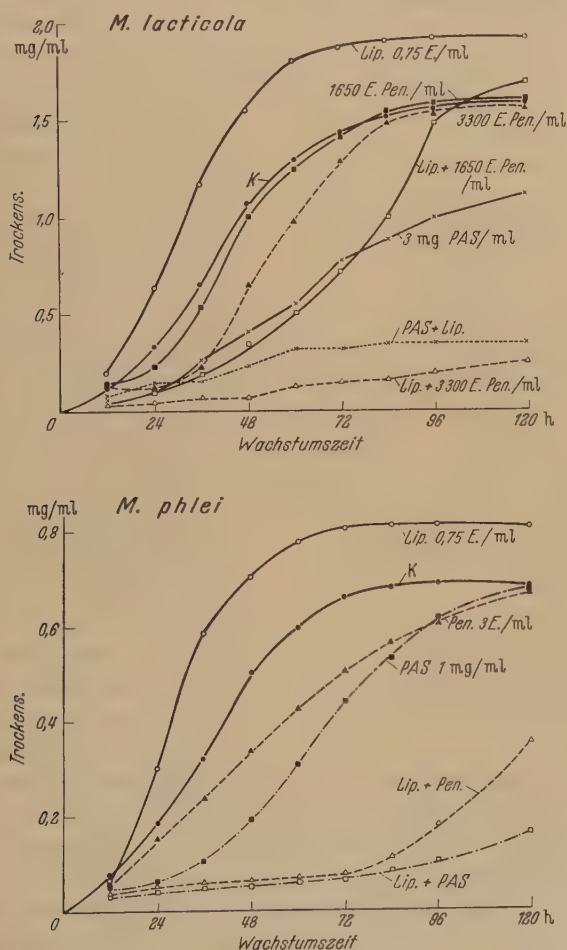


Abb. 1. Zunahme der Trockensubstanz in Abhängigkeit von der Zeit in Gegenwart von Lipase und Antibioticis bei *Mycobact. lacticola* und *Mycobact. phlei*

Nach HIRSCH (1947) sollte zur Kennzeichnung eines antibakteriellen Effektes die manometrische Methode herangezogen werden, da sie es gestattet, die Wirkung unmittelbar nach Zusatz des Präparates abzulesen. Um die Wirkung von Lipase und Antibioticis bei den Mycobakterien genauer zu verfolgen, wurde die Bakterienatmung eingehender

untersucht. Bei Darstellung der Sauerstoffaufnahme je Zeiteinheit in Abhängigkeit von der Zeit in einem halblogarithmischen Koordinatensystem erscheint die Exponentialkurve der Keimvermehrung bzw. des Absterbens einer Kultur als Gerade, deren Neigung ein Maß für die Vermehrungs- bzw. Absterbegeschwindigkeit ist.

Um schnell ablesbare Werte zu erhalten, war eine größere Bakterieneinsaat als bei dem Röhrenverdünnungstest erforderlich; dementsprechend wurden auch die Substanzen in höheren Konzentrationen zugesetzt. 24 Std-Kulturen, die in Erlenmeyerkolbengeschüttelt waren und ein üppiges Wachstum zeigten, wurden abzentrifugiert und in frischer Nährlösung aufgenommen. Die Bakterieneinsaat wurde entweder durch Trübungsmessung bestimmt oder mikroskopisch ausgezählt. Bei *Mycobact. lacticola* betrug die Einsaat ungefähr $1,5 \cdot 10^8$ Zellen, bei *Mycobact. phlei* ungefähr 10^8 Zellen je Milliliter. Bei den Wachstumsmessungen wurde der Sauerstoffverbrauch je Warburg-Gefäß (2 ml) aufgezeichnet, um die Wirkung der Antibiotica deutlich sichtbar zu machen. 1 Std nach Versuchsbeginn wurden die Antibiotica zugesetzt; die Lipase befand sich bereits zu Versuchsbeginn in der Nährlösung.

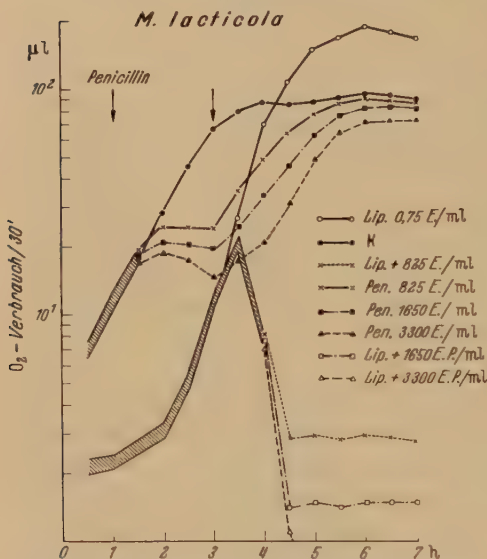


Abb. 2. Einfluß von Penicillin und Lipase auf die Atmung wachsender Zellen von *Mycobact. lacticola*

Zeitspanne blieben die behandelten Zellen gegenüber der Kontrollkultur in ihren Atmungswerten zurück. Bei Zusatz von 3300 E Pen./ml sank die Atmung für 90 min und stieg dann wieder an. Die Atmungskurve verlief nunmehr parallel zur Kontrolle. Bei geringeren Penicillin-Konzentrationen war die Atmungssenkung von kürzerer Dauer. Da *Mycobact. lacticola* gegenüber Penicillin resistent ist, trat zunächst zwar eine Hemmung ein, die jedoch nicht bestehen blieb. Unter dem Einfluß von 0,75 E. Lipase/ml war die Atmung zunächst gering, stieg nach 2 Std an, übertraf noch die in der Kontrolle und war nach 6 Std maximal. Die Keime vermehrten sich trotz Absinkens der Atmungskurve weiter, wenn auch mit abnehmender Geschwindigkeit. — Der verzögerte Atmungsanstieg in Gegenwart von Lipase kann vielleicht mit der Umstellung der Bakterien auf ein anderes Substrat erklärt werden. Da die Lipasewirkung sehr schnell einsetzte und das Präparat reich an Stickstoff war, begannen

nach ungefähr 2 Std die Bakterien, die ihre Säurefestigkeit inzwischen verloren hatten, sich lebhaft zu vermehren. Wurde diesen Bakterien, bei gleicher Atmungsgröße wie in der Kontrollkultur, Penicillin zugesetzt, so zeigte sich eine Wirkungsänderung des Antibioticums. Zwar war auch jetzt wieder eine halbstündige Latenzphase zu beobachten, doch sank dann die Atmungsgröße schnell ab; sie war bei einer Konzentration von 3300 E Pen./ml schon nach 2 Std nicht mehr meßbar. Es trat, wie oben erwähnt, eine Lyse ein, die zu einem Stillstand der Atmung führte. Bei geringeren Konzentrationen nahm die Atmung ebenfalls stark ab, um dann auf einer gewissen Höhe gleich zu bleiben; es trat keine Zellvermehrung mehr ein. Nach HIRSCH (1951) könnte man die Wirkungsweise des Penicillins in der Konzentration von 3300 E/ml in Gegenwart von Lipase als „degenerativ“ bezeichnen: nach einer Latenzphase tritt langsame Lyse, verbunden mit Keimtod, ein. Zu bemerken ist aber, daß hier die Atmung verhältnismäßig schnell absank. — Der Zusatz von Lipase ermöglichte demnach dem Penicillin, die Zellen anzugreifen, ihre Vermehrung wurde unterbunden, und bei der höchsten verwendeten Konzentration erfolgte sogar Keimtod. Überimpfungsversuche bestätigten dieses Ergebnis.

Gegenüber dem Penicillin zeichnete sich das Na-Salz der p-Aminosalicylsäure dadurch aus, daß keine Latenzphase eintrat. Seine hemmende Wirkung setzte sofort mit zunehmender Wirkstoffkonzentration unter dauernder Beeinflussung der Vermehrungsgeschwindigkeit ein (Abb. 3). Selbst bei einer Konzentration von 10 mg PAS/ml vermehrten sich die Keime noch. PAS in Gegenwart von Lipase ließ die Atmung sofort absinken, während die Atmungskurve bei einer PAS-Konzentration von 3 mg/ml mit 0,75 E Lipase/ml parallel zur Abszisse verlief (Bacteriostase nach CHURCHMAN 1912).

Nach Abb. 4 wirkte Isonicotinsäurehydrazid (INH) je nach angewendeter Konzentration vorübergehend wachstumshemmend. Bei Kombination mit Lipase sank nach einer Latenzphase die Atmung für

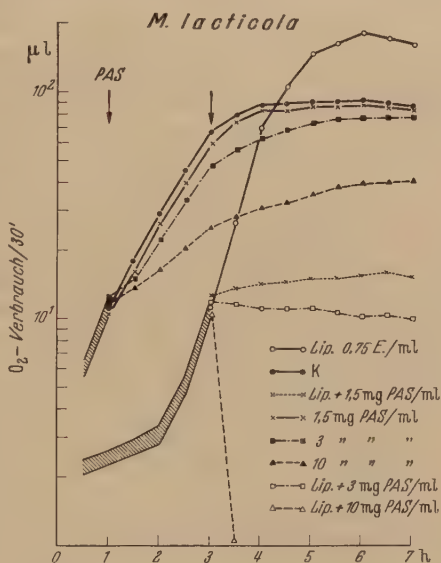


Abb. 3. Wirkung von PAS und Lipase auf die Atmung wachsender Zellen von *Mycobact. lacticola*

90 min ab und blieb dann konstant. Es ist anzunehmen, daß ein Teil der Bakterien, die physiologisch angreifbar waren, abgetötet wurde, während die restlichen Zellen ihre Vermehrungsfähigkeit verloren.

Geringe Dosen von Dihydrostreptomycinsulfat (DHS) beeinflussten bereits die Atmung von *Mycobact. lacticola*, wie der Kurvenabfall zeigt (Abb. 5); ein völliger Keimtod trat aber auch bei höheren Konzentrationen nicht ein. SCHULER (1947) beobachtete eine ähnliche Streptomycinwirkung bei gramnegativen Keimen. Die Kombination von Streptomycin mit Lipase wirkte besonders stark (Abb. 5).

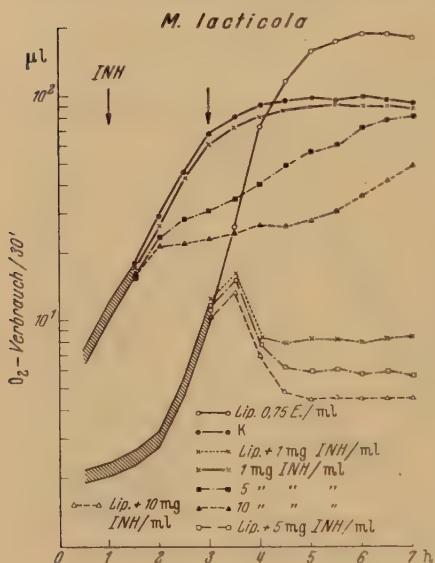


Abb. 4.

Wirkung von INH und Lipase auf die Atmung wachsender Zellen von *Mycobact. lacticola*

Protein), vom Bacterium als Stickstoffquelle ausgenutzt. Außerdem ist möglich, daß Stoffwechselprodukte der Bakterien durch das vollwirksame Ferment gespalten wurden und sekundär als Stickstoffquelle dienten. Mikroskopisch waren keine Veränderungen der mit Trypsin behandelten Zellen erkennbar. Außerdem waren sie stark säurefest und wurden demnach durch dieses Ferment nicht angegriffen.

Wurde einer wachsenden Kultur von *Mycobact. lacticola* sowohl Trypsin als auch Penicillin zugesetzt, so wirkte Penicillin in Gegenwart von Trypsin nicht. Sogar die kurze Hemmperiode wurde noch zugunsten der wachstumsfördernden Protease reduziert (Abb. 6). Dieser Versuch wies darauf hin, daß das im Lipase-Präparat vorhandene Trypsin nicht für die resistenzmindernde Wirkung verantwortlich gemacht werden kann. Auch in Gegenwart der anderen Antibiotica und Chemotherapeutica blieb das Trypsin wirkungslos auf die Resistenz. Im gefärbten Präparat

Da das verwendete Lipase-Präparat noch 3 E Trypsin/ml enthielt, mußte geprüft werden, ob Trypsin allein auf das Mycobakterium wirkt. Ein hochgereinigtes Trypsin-Präparat (Fa. Novo) wurde benutzt, und das Wachstum bei 3 E/ml beobachtet. Trypsin verursachte eine Atmungssteigerung gegenüber der Kontrolle (Abb. 6). Auch bei Zusatz von Trypsin zur lipasehaltigen Nährlösung stieg die Atmung etwas stärker an, doch geringer als bei Trypsin allein. Vermutlich wurde die Trypsinlösung mit 0,425 mg Stickstoff/ml, davon 0,0005 mg Eiweiß (das Ferment selbst als

zeigten die Bakterien, die in Gegenwart von Trypsin + Penicillin gewachsen waren, starke Säurefestigkeit.

Mycobact. phlei erwies sich zwar gegenüber Penicillin empfindlicher als *Mycobact. lacticola*, war jedoch ebenfalls penicillinresistent. Nach Zusatz von 200 E Pen./ml wurde vorübergehend — für 1 Std — die Zellatmung beeinflusst, so lange, bis die Bakterien sich an das neue Medium gewöhnt hatten, dann stieg die Atmungskurve erneut an

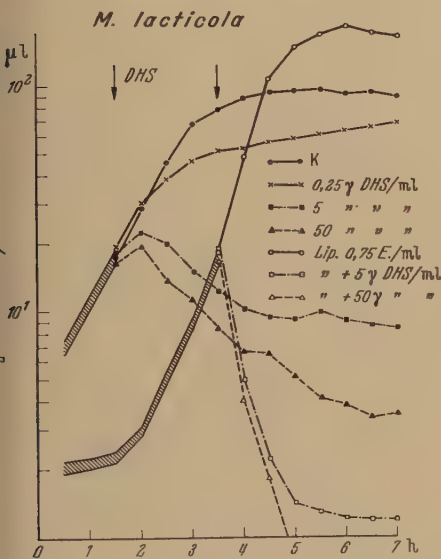


Abb. 5.
Wirkung von DHS und Lipase auf die Atmung wachsender Zellen von *Mycobact. lacticola*

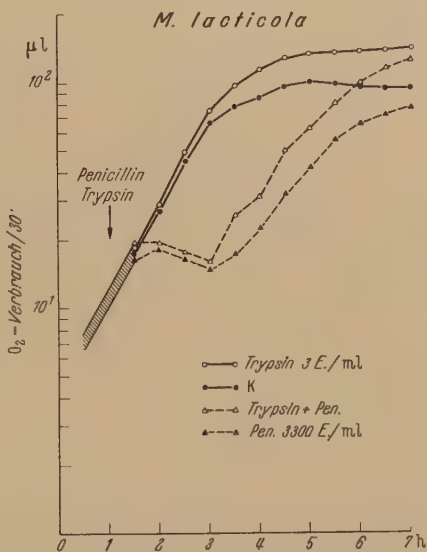


Abb. 6. Einfluß von Trypsin und Penicillin auf die Atmung wachsender Zellen von *Mycobact. lacticola*

(Abb. 7). Die gleiche Wirkung zeigte das Penicillin in höherer Konzentration bei *Mycobact. lacticola* (Abb. 2). Bei Kombination von Lipase mit Penicillin setzte nach einer halbstündigen Latenzphase die Antibioticawirkung ein; zunächst sank die Atmung schnell, dann langsam ab. Der Wirkungstyp ist als „degenerativ“ zu bezeichnen.

Auch PAS beeinflusste allein und in Kombination mit Lipase die Atmung von *Mycobact. phlei*. Der Verlauf der Kurven entspricht dem in Abb. 3.

Wie PAS, so wirkte ebenfalls INH auf die Vermehrungsgeschwindigkeit von *Mycobact. phlei* ein. 1 mg INH/ml hatte eine ähnliche Wirkung wie 5 mg INH/ml bei *Mycobact. lacticola*. In Kombination mit Lipase war das Verhalten jedoch anders: Nach kurzem Absinken stieg die Atmung kontinuierlich an. Eine Bacteriostase ergab sich nicht. Vielleicht hängt

die geringe Wirkung von Lipase + INH bei *Mycobact. phlei* mit der schwachen Säurefestigkeit zusammen.

DHS beeinflusste bereits in niedrigen Dosen die Atmung von *Mycobact. phlei*. Trotzdem konnte durch den Zusatz von Lipase die DHS-Aktivität noch gesteigert werden. Während bei Einwirkung von 5 γ DHS/ml die Keimvermehrung aufhörte, trat in Gegenwart von 5 γ DHS/ml + Lipase

langsamer Keimtod ein. Die abfallende Atmungskurve gleicht fast derjenigen, die mit 50 γ DHS/ml erhalten wurde.

Trypsin war bei beiden untersuchten saprophytischen Mycobakterien-Stämmen gleichermaßen wachstumsfördernd. Bei *Mycobact. phlei* hatte das Trypsin ebenfalls keine resistenzmindernde Wirkung in Gegenwart der Antibiotica.

Die pathogenen Mycobakterien wurden nicht zu Wachstumsversuchen in der Warburg-Apparatur herangezogen, da wegen der geringen Wachstumsgeschwindigkeit keine fehlerfreien Ergebnisse zu erhalten sind.

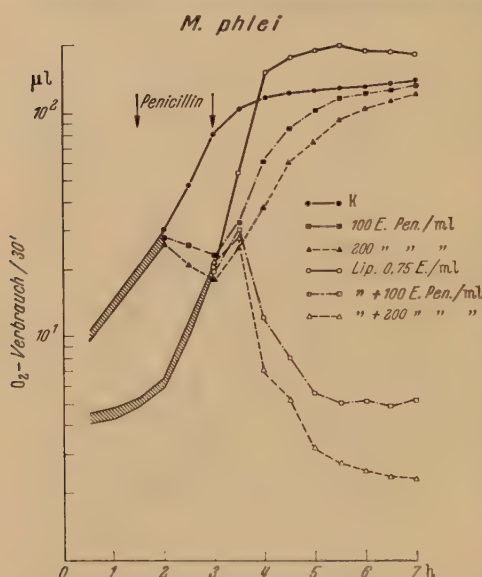


Abb. 7. Wirkung von Penicillin und Lipase auf die Atmung wachsender Zellen von *Mycobact. phlei*

Vergleichsmessungen mit *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus*

Aus den Ergebnissen der Atmungsversuche mit Mycobakterien ergibt sich die Frage, wie sich „normale“ Bakterien verhalten, ob sie durch Lipase beeinflusst werden und ob Lipase bei ihnen die Resistenz gegenüber Antibiotica herabsetzt.

Zu Vergleichsuntersuchungen wurden ein streptomycinempfindlicher und ein streptomycinresistenter Stamm von *Escherichia coli* sowie ein penicillinsensibler und ein penicillinresistenter *Staphylococcus aureus*-Stamm herangezogen. Auch hier wurde die manometrische Methode angewendet. Die Kulturen wurden auf Bouillon-Lösung, die 1% Pepton, 1% Fleischextrakt, 0,5% Kochsalz und 1% Glucose enthielt, 18 Std bei 37°C vorgezogen, und mit einer Kulturverdünnung 1:25 wurden die Warburg-Gefäße beschickt.

DHS zeigte bei *E. coli* (Nr. 427) in einer Konzentration von 50 γ /ml die von SCHULER (1947) erwähnte Wirkung (Abb. 8). Lipase vermochte die Atmung kaum zu steigern, sondern bewirkte, wenn auch nur kurz-

fristig, einen geringen Atmungsabfall. Lipase in Verbindung mit DHS erhöhte die Antibioticawirkung nicht, vielmehr war ein Wirkungsabfall des DHS gegenüber diesem *Coli*-Stamm festzustellen, obgleich auch hier das degenerative Verhalten zum Ausdruck kam. Trypsin veränderte den Atmungsverlauf gegenüber der Kontrolle nicht, während es in Gegenwart von DHS dessen Wirkung reduzierte. Aus dem Versuch ist ersichtlich, daß Lipase die Bakterienzelle nicht veränderte, sondern sekundär die Wirkung des Antibioticums abschwächte. Die Wirkung von Trypsin war ähnlich. — Im Vitalpräparat und im nach Gram gefärbten Präparat zeigten sich hinsichtlich Morphologie und Färbung bei Gegenwart von Lipase oder Trypsin keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrollkultur.

Der resistente Stamm von *E. coli* (Nr. 385) verhielt sich ähnlich wie der sensible. 10 mg DHS/ml bewirkten einen Abfall der Atmungskurve, während in Gegenwart von Trypsin oder Lipase diese Wirkung zunächst etwas reduziert wurde, sich aber später der DHS-Wirkung anglich.

Ein *Staph. aureus*-Stamm (Nr. 1196) wurde ausgewählt, der bereits durch 0,03 E Pen./ml gehemmt wurde, also stark sensibel war. Die Warburg-Versuche zeigten nun, daß dieser Stamm auch durch 0,75 E Lipase/ml

im Wachstum gehemmt wird; die Atmung sank auf unmeßbare Werte ab. Bei einer Lipaselösung mit 0,37 E/ml stieg die Atmungsgröße nur vorübergehend an, fiel dann aber stark ab. Die Kombination von Lipase + 0,01 E Pen./ml ergab einen ähnlichen Kurvenverlauf wie Lipase allein, jedoch eine stärkere und schnellere Hemmwirkung als Penicillin allein. Von Bedeutung ist, daß ebenfalls 3 E Trypsin/ml, wenn auch nicht so stark, die Atmung hemmten (Abb. 9). Die Kombination Trypsin + Penicillin wirkte bei *Staph. aureus* wie Trypsin allein. Beide Fermente, Lipase und Trypsin, müssen für den Atmungsabfall des sensiblen *Staph. aureus*-Stammes verantwortlich gemacht werden. Es wurden noch weitere sensible Staphylokokken-Stämme untersucht, die sich analog verhielten. — Mikroskopisch zeigten die behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle starke morphologische Veränderungen. Die in Enzymlösung gewachsenen Kokken waren deformiert, gequollen und

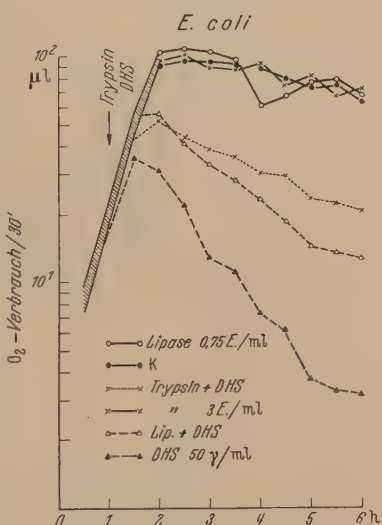


Abb. 8. Einfluß von DHS, Trypsin und Lipase auf die Atmung wachsender Zellen von *E. coli* (Nr. 427)

autolysiert, in ähnlicher Weise wie bei Penicillineinfluß. Die Ergebnisse mit diesen Staphylokokken-Stämmen zeigen, daß ein direkter Vergleich mit den Mycobakterien nicht möglich ist. Mycobakterien sind resistent gegenüber Penicillin, während die untersuchten Stämme hoch sensibel waren. Doch ist die Beobachtung erwähnenswert, daß ein *Staphylococcus*-Stamm, der durch Penicillin in seinem Wachstum gehemmt wurde, auch bei Enzymlösung oder Trypsin nicht mehr lebensfähig war.

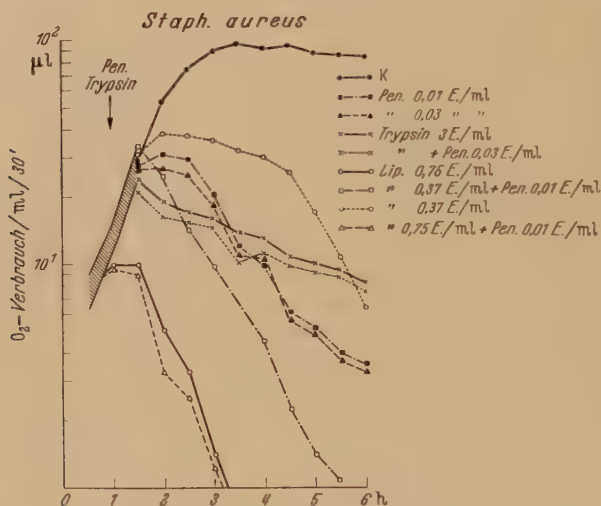


Abb. 9. Einfluß von Penicillin, Trypsin und Lipase auf die Atmung wachsender Zellen von *Staphylococcus aureus* (Nr. 1196)

Mycobact. tuberculosis, Typus *humanus*, wurde zwar durch hohe Lipase-Konzentrationen in seinem Wachstum gehemmt, nicht aber durch Trypsin.

Lipaselösung verursachte bei einem penicillinresistenten *Staph. aureus*-Stamm (Nr. 710/54) eine Wachstumssteigerung gegenüber der Kontrollkultur (Abb. 10). Durch 1000 E Pen./ml wurde die Atmung für nur kurze Zeit reduziert, stieg aber dann steil an. Lipaselösung setzte die Penicillin- und DHS-Wirkung herab. Auch Trypsin förderte das Wachstum und minderte dadurch die Antibiotica-Wirkung.

Die an *E. coli* und an penicillinresistenten Stämmen von *Staph. aureus* gewonnenen Ergebnisse lassen erkennen, daß die Enzymlösung die Antibiotica-Wirkung nicht erhöhte. Da sich eine Trypsinlösung mit 3 E/ml analog der Enzymlösung verhielt, ist anzunehmen, daß das Trypsin in der Enzymlösung wirkte, und die Eiweißstoffe der Nährlösung proteolytisch gespalten wurden. Die Wachstumsförderung war als indirekte Fermentwirkung anzusehen. Demnach trat die Lipase nicht in Funktion.

Das Verhalten eines Ferment-Glycerin-Präparates¹

Für eine weitere Versuchsreihe wurde ein zweites Ferment-Präparat herangezogen, „Pyosolva“¹, das 1,5 Lipase E/ml, 18 E Trypsin und 10 E Amylase/ml enthält. Es handelt sich hierbei um einen Glycerin-auszug. In in vitro-Versuchen von WOLF u. DZIUBA (1953) sowie PESCHKE u. WEBER (1954) erwies sich „Pyosolva“ tuberculostatisch wirkend. Es wurden daher eigene Versuche mit diesem Präparat und seinen Einzelkomponenten durchgeführt.

Eine gebrauchsfertige „Pyosolvalösung“, die in 70%igem Glycerin die Fermente gelöst enthält, wurde mit Phosphatpuffer (pH 7,2) 1 : 1 verdünnt und mit einer Aufschwemmung einer 16tägigen *Mycobact. tuberculosis*-Kultur (ungefähr 2 mg Frischgewicht) beimpft. Parallel dazu wurden Kulturröhrchen mit Glycerin + Puffer, mit 0,75 E/ml Lipaselösung und schließlich mit 9 E/ml Trypsin angesetzt. Nach 0, 3, 6, 24 und 48 Std bei 37°C wurden aus diesen Kulturlösungen je 0,05 ml/ml (1 Tropfen) in sterile Nährlösung gegeben und 16 Tage bebrütet.

Die Versuchsergebnisse (Tab. 2) lassen eine deutlich hemmende Wirkung des „Pyosolva“, ebenso aber auch der wäßrigen Lipaselösung erkennen; bei Trypsin dagegen ergab sich noch nach 4 Wochen ein Wachstum. In erster Linie ist demnach die hemmende Wirkung der Lipase zuzuschreiben. Außerdem darf bei den hohen Konzentrationen (35%) die antibakterielle Wirkung des Glycerins nicht unberücksichtigt bleiben.

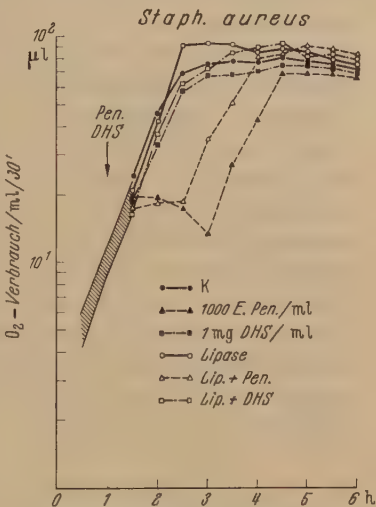


Abb. 10. Einfluß von Penicillin, DHS und Lipase auf die Atmung wachsender Zellen von *Staphylococcus aureus* (Nr. 710/54)

Tabelle 2. Einfluß der verschiedenen Substanzen auf *Mycobact. tuberculosis*

	0 Std	3 Std	6 Std	24 Std	48 Std	16 Tage	Mikroskop. Bild bei 48-Std-Kultur nach 16 Tg.
1. Pyosolva . . .	++	++	++	+	±	—	vereinzelte Granula, nicht säurefest
2. Glycerin 70% . + Puffer 1 : 1 .	++	++	++	+	+	±	makr. ungefähr 30 Kolonien; Granula
3. Puffer	++	++	++	++	++	++	säurefeste Stäbchen
4. Lipase 0,75 E/ml	++	++	+	+	—	—	nicht säurefeste Granula
5. Trypsin 9 E/ml .	++	++	++	++	+	+	säurefeste Stäbchen
6. Kontrolle . . .	++	++	++	++	++	++	säurefeste Stäbchen

¹ Der Kali-Chemie A.G. Hannover danke ich für die Überlassung des Präparates.

Bei *Mycobact. tuberculosis*, Typus *gallinaceus*, war das Ergebnis ähnlich, nur wirkte Glycerin geringer wachstumshemmend.

Sowohl bei *Mycobact. lacticola* als auch bei *Mycobact. phlei* entsprachen die Testergebnisse mit „Pyosolva“ denen mit Lipase. Es war keine wesentliche Hemmung innerhalb einer 48stündigen Einwirkung festzustellen. Wurde jedoch ein kleiner Unterschied zwischen „Pyosolva“ und Lipase deutlich, so beruhte dieser auf der antibakteriellen Wirkung des Glycerins, denn im Verdünnungstest wirkte eine 40%ige Glycerinlösung hemmend auf das Wachstum der Saprophyten. Atmungsmessungen brachten gleiche Ergebnisse. —

Kombinationsversuche von „Pyosolva“ (1 : 40 verdünnt) mit DHS bei dem Teststamm *Mycobact. tuberculosis* ergaben entsprechend den oben angeführten Versuchen mit 0,04 E Lipase/ml dieselbe Minderung der Resistenz, d. h. eine weit bessere Ansprechbarkeit gegenüber DHS. Der Stamm, der ohne „Pyosolva“-Zusatz erst bei 62,5 γ DHS/ml Wachstumshemmung zeigte, wurde in Gegenwart von „Pyosolva“ schon bei einer Konzentration von ungefähr 7,8 γ DHS/ml völlig gehemmt. Das im „Pyosolva“ vorhandene Trypsin besitzt keine antibakterielle Wirkung. Die im Präparat enthaltene Lipase (0,75 E/ml) wirkt dagegen tuberculostatisch. „Pyosolva“ 1 : 40 verdünnt, bzw. 0,04 E Lipase/ml, ermöglichen eine Aktivitätssteigerung des Streptomycins.

Wachstumsversuche mit Salzen und Antibioticis

Wachstumsmessungen bei Zusatz von Salzen und Antibioticis mit Mycobakterien

Die bisherigen Untersuchungen bewiesen, daß Lipase infolge Änderung der Zellgrenzschicht von Mycobakterien die Aktivität von Antibioticis und Chemotherapeuticis steigert. Ob und wie weit es möglich ist, durch Zusetzen überoptimaler Salzkonzentrationen die Aktivität von Antibioticis zu beeinflussen, sollen die folgenden Versuche zeigen.

Nach HEINZEL (1950) und VOSS (1952) verändern Neutralsalze in überoptimalen Konzentrationen die Bakterien in Gestalt und Größe und hemmen in hohen Konzentrationen das Wachstum.

SORKIN (1951) beobachtete eine metallkomplexe Bindung zwischen Kupfer und Oxin, wodurch die tuberculostatische Wirkung des Oxins verstärkt wurde, während Cu^{++} -Ionen, allein getestet, wirkungslos blieben. In einer späteren Veröffentlichung des Verfassers (1951) wurde auch eine Erhöhung der PAS-Wirkung durch Cu^{++} -Ionen angegeben.

PRATT u. Mitarb. (1948) fanden eine Verdoppelung der Penicillinwirkung bei Zusatz von Kobaltionen zum Substrat. Nach SCHADE (1949) zeigte sich eine antibakterielle Wirkung von Kobalt gegenüber verschiedenen Bakterienarten. GILLISSEN (1953) beschreibt die bacteriostatische und bactericide Wirkung des CoCl_2 bei *Mycobact. tuberculosis*.

Da nach VOSS (1952) bei den Chloriden zu Beginn des Wachstums sowohl die quellenden als auch die entquellenden Ionen eine Vergrößerung der Bakterienzelle

bewirken, wurden für eigene Versuche verschiedene Kationen bei gleichem Anion gewählt. Folgende Chloride wurden geprüft: NaCl und LiCl als Alkalisalze und CaCl_2 , MgCl_2 und BaCl_2 als Erdalkalisalze. Die angegebenen Konzentrationen bedeuten jeweils die Endkonzentration der Salze in der Nährlösung.

Im Verdünnungstest zeigten *Mycobact. lacticola* und *Mycobact. phlei* in 0,5 mol MgCl_2 -, NaCl- oder LiCl-Lösung makroskopisch ein gutes Wachstum, während BaCl_2 nur bei einer Konzentration von 0,12–0,06 mol Lösung ein Wachstum zuließ. Bereits 1 molare Lösungen der Salze verminderten das Wachstum im Vergleich zur Kontrolle stark; höhere Konzentrationen riefen eine Bacteriostase hervor. Niedrigste Konzentrationen von CaCl_2 bewirkten schlechtes Wachstum; mikroskopisch waren nur Kurzstäbchen und Granula zu beobachten. Deshalb wurde dieses Salz ausgeschlossen. — Mikroskopisch zeigten sich in 0,5 und 0,25, bzw. 0,12 mol Lösungen von NaCl, MgCl_2 , LiCl und BaCl_2 vergrößerte Zellen, die meistens etwas verlängert oder sogar zu Fäden ausgewachsen waren, ohne aber ihre Säurefestigkeit vollständig verloren zu haben. Nur einige Zellen waren nicht mehr säurefest. Das entspricht der Ansicht von PORTER u. YEGIAN (1945), daß nur völlig intakte Zellen säurefest sind, während schon bei geringfügigen Schädigungen diese Säurefestigkeit verlorenggeht. — Die Versuche zeigten also, daß nicht nur die quellenden Alkalisalze, sondern auch die entquellenden Erdalkalisalze eine Vergrößerung der Einzelzelle hervorriefen.

Da *Mycobact. lacticola* eine hohe Resistenz gegenüber dem Antibioticum Penicillin besitzt, wurde dieses zu Kombinationsversuchen verwendet. Im Verdünnungstest wurde mit fallenden Antibiotica-Konzentrationen bei feststehender Salzkonzentration gearbeitet. In Anwesenheit von 0,5 mol MgCl_2 war Penicillin bereits bei 1650 E/ml wachstumshemmend, während dieselbe Penicillin-Konzentration ohne MgCl_2 nach 48 Std Bebrütung ein starkes Wachstum zuließ. Auch ein Zusatz von 0,25 mol MgCl_2 beeinflusste die Antibiotica-Aktivität noch nachweisbar. — Zusatz von BaCl_2 in Konzentrationen von 0,12 und 0,06 mol verzögerte stark das Wachstum und erhöhte die Aktivität des Penicillins. Bei einer Konzentration von 3300 E Pen./ml + 0,12 mol BaCl_2 war das Wachstum vollständig gehemmt. Auch nach Überimpfung auf ein frisches Medium fand kein Wachstum statt. Unter dem Einfluß von 1650 E Pen./ml + 0,12 mol BaCl_2 trat dagegen keine vollständige Hemmung mehr ein. Auch in Gegenwart von 3300 E Pen./ml + 0,06 mol BaCl_2 verzögerte sich das Wachstum. BaCl_2 , das allein schon stark hemmend wirkte — nach KAHÖ (1926) steigt die Wachstumshemmung mit dem Entquellungsvermögen — beeinflusste die Aktivität des Antibioticums nur gering. Das kann wahrscheinlich mit der entquellenden Wirkung des Ba^{++} -Ions erklärt werden, obgleich andererseits gerade durch BaCl_2 nach VOSS (1952) ein starkes Auswachsen der Mycobakterienzelle erreicht wurde.

Bei eigenen Untersuchungen war sowohl in synthetischer Nährlösung als auch in Bouillon die Einzelzelle nur wenig vergrößert. Ob ein Bakterium in seiner äußeren Form verändert wird, hängt wahrscheinlich vom Medium ab. — 3300 E Pen./ml und 1650 E Pen./ml waren in 0,25 mol LiCl-Lösung wirksam. Bei 0,12 mol LiCl war die Penicillin-Aktivität geringer. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich mit NaCl. Nach Überimpfung der behandelten Bakterien auf frische Nährlösung waren alle Röhrchen

bewachsen; es war nur eine Bacteriostase eingetreten.

Die Sensibilität von *Mycobact. lacticola* gegenüber DHS wurde durch LiCl und NaCl noch gesteigert.

Die Wirkung des PAS auf *Mycobact. phlei*, das gegenüber dieser Substanz resistent ist, wurde durch LiCl kaum, durch $MgCl_2$ etwas erhöht.

Um die Ergebnisse der Röhrchenversuche zu festigen, wurden Atmungsmessungen durchgeführt. Die Versuchsanordnung war die gleiche wie mit Lipase, nur wurden die einzelnen Salze mit dem Antibioticum zusammen in die Nährlösung gegeben.

Aus Abb. 11 geht hervor, daß 0,25 mol LiCl sofort nach Zugabe die Atmungsgrößen reduzierte, und zwar nicht nur vorübergehend, sondern

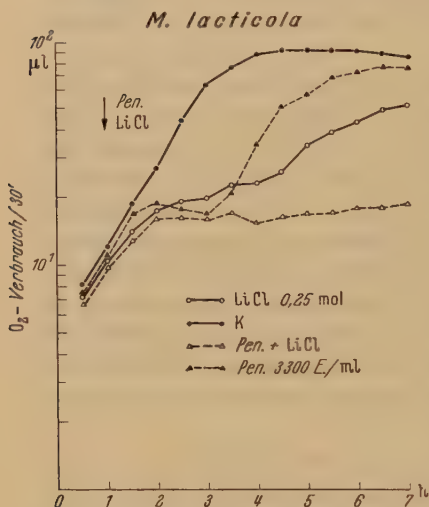


Abb. 11. Wirkung von Penicillin und LiCl auf die Atmung wachsender Zellen von *Mycobact. lacticola*

während des beobachteten Wachstumsverlaufes. Bei Zusatz von 3300 E Pen./ml + 0,25 mol LiCl setzte nach einstündigem verzögertem Wachstum — wie bei 0,25 mol Salzlösung allein — eine verstärkte Hemmung der Atmung ein, die durch die Kombination von Penicillin + Salz hervorgerufen wurde. Es trat keine erneute Keimvermehrung ein. Die Kombination Penicillin + LiCl bewirkte demnach eine Bacteriostase. Wie Abb. 11 zeigt, besteht zwischen Penicillin und LiCl in ihrer Wirkung ein Synergismus, der erst nach einer gewissen Einwirkungszeit deutlich wird. — $BaCl_2$ hemmte das Wachstum stärker als LiCl und erhöhte noch deutlicher die Penicillinwirkung.

Die Warburg-Versuche lassen erkennen, daß die Kombination Penicillin-Salzlösung das Wachstum von saprophytischen Mycobakterien mehr beeinträchtigt als die Einzelkomponenten. Wenn auch, wie im Röhrchenversuch gezeigt wurde, bei geringeren Salzkonzentrationen die Hemmung abnahm, also die Wirkung hauptsächlich den Salzen zugesprochen werden muß, ist doch zu betonen, daß sowohl die Penicillin-

Konzentration 3300 E/ml als auch die Salzlösung ein Wachstum erlaubten, und erst bei deren Kombination eine Vermehrung der Bakterien ausblieb.

*Röhrchen- und Plattenversuche
mit Staphylococcus aureus*

Sowohl der penicillinsensible (Nr. 1196) als auch der penicillinresistente (Nr. 710/54) *Staph. aureus*-Stamm wurden durch erhöhte Salzkonzentrationen morphologisch verändert. Im Vergleich zu den Mycobakterien waren hier stärkere Salzkonzentrationen verträglich, so daß eine 1 molare LiCl- oder $MgCl_2$ -Lösung noch ein gutes, nur wenig verzögertes Wachstum zuließ. Als Nährsubstrat diente Bouillon.

Die Kokken waren unter dem Einfluß (24 Std) einer 1 mol Salzlösung auf 2—2,5 μ , gegenüber normal 1—1,5 μ , vergrößert. Zusatz von 0,5 mol Salzlösung zum Medium vergrößerte ebenfalls die Kokkenform, und zwar LiCl noch ausgeprägter als $MgCl_2$. Hierin kommt wieder die stärkere Wirkung des Alkalisalzes als quellenden Salzes im Vergleich zum Erdalkalisalz als entquellendem Salz zum Ausdruck.

0,5 mol LiCl bzw. $MgCl_2$ erhöhte die Empfindlichkeit des sensiblen Staphylokokken-Stammes gegenüber Penicillin und DHS gering. Der resistente Stamm verhielt sich analog. Die Kokken, die sich noch bei Zusatz von 1000 E Pen./ml entwickelten, wuchsen nicht mehr in Gegenwart von 0,5 mol Salzlösung + 1000 E Pen./ml, wohl aber bei 0,25 mol Salzlösung mit Penicillin. Bei dieser Salzkonzentration waren die Zellen nur geringfügig vergrößert, und das Wachstum glich dem der Kontrollkultur.

Auch im antibiotischen Agar-Plattentest zeigte sich eine geringe Vergrößerung der Hemmzonen, wenn 0,1 ml Penicillinlösung mit $MgCl_2$ (0,5 mol) in ein gestanztes Loch pipettiert wurde, oder wenn die Salzlösung in den Agar (Endkonzentration 0,5 mol) gegeben und Penicillin allein getestet wurde.

Aus den Versuchen mit verschiedenen Neutralsalzen ist ersichtlich, daß sich die quellenden und entquellenden Kationen in Verbindung mit Chlor als Anion in ihrer Wirkung sowohl auf Mycobakterien als auch auf Staphylokokken nicht wesentlich unterscheiden. Alle untersuchten Salze verändern in unerschwelligen Dosen die Morphologie und verzögern das Wachstum. Bei Kombination der Salze mit Penicillin, PAS oder DHS wirken die Einzelkomponenten zusammen, und das Wachstum des einzelnen Bakterienstammes wird reduziert. Die Wirkung kann als Potenzierung der Kräfte, Synergismus, angesehen werden, wobei unbeantwortet bleibt, ob etwa das Antibioticum infolge Anwesenheit des Salzes besser zur Wirkung kommt.

Versuche mit „ruhenden“ Bakterien

Der Einfluß von Lipase, Trypsin und Antibioticis auf „ruhende“ Mycobakterien

Bakterien einer „ruhenden“ Kultur atmen lediglich in einer Kohlenhydrat-Puffer-Lösung, ohne sich, wegen Mangels an assimilierbaren stickstoffhaltigen Substanzen, zu vermehren. Manometrische Messungen der Atmung solcher Bakterien zeigen gleichbleibende Atmungsgrößen, die nur infolge Autolyse der Zellen langsam geradlinig abfallen.

24-Std-Kulturen der saprophytischen Mycobakterien wurden von der Nährlösung abzentrifugiert, gewaschen und in Phosphatpuffer pH 7,2 mit einem Zusatz von 0,5% Glucose aufgenommen. Die Bakterienzahl wurde densitometrisch bestimmt. Die Atmungsmessung an „ruhenden“ Bakterien erforderte ungefähr die dreifache Bakterienzahl wie die Wachstumsversuche. — Bei *Mycobact. tuberculosis* wurden die Bakterienkolonien einer 20 Tage alten Kultur vom Agar geschabt (Substrat 4 HOHN), fein verrieben und mit 0,5% Glucose + Phosphatpuffer pH 7,2 aufgeschwemmt, so daß eine homogene Suspension entstand. Die Bakterienaufschwemmung wurde gleichmäßig auf die Warburg-Gefäße verteilt. Der virulente Stamm zeigte wie die saprophytischen Stämme eine gleichbleibende Atmung.

In den vorangegangenen Versuchen wurden die wachsenden Mycobakterien durch Antibiotica-Lipase-Kombination in ihrer Atmung gehemmt, doch konnte nicht erklärt werden, ob die Atmungsstörung auf einer Schädigung von Atmungsfermenten beruht oder ob andere physiologische Prozesse beeinträchtigt werden. Handelt es sich um eine Störung des Atmungsprozesses, so wird auch die Atmung „ruhender“ Bakterien gehemmt.

Eigene Versuche bestätigten die Ergebnisse anderer Autoren, wie HIRSCH (1947), WAGNER (1951), daß die „ruhenden“ Zellen von *Mycobact. tuberculosis* durch Streptomycin und PAS nicht angegriffen werden. Die Ruheatmung der Bakterien wird durch Antibiotica nicht beeinflusst, durch INH (im Gegensatz zu ARONSON 1952), selbst bei 5 mg/ml, nur unwesentlich (siehe Abb. 13). Demnach wurden die „ruhenden“ Zellen von *Mycobact. tuberculosis* durch INH nicht abgetötet. Auch bei den Saprophyten wurde die Atmung durch Antibiotica nicht gehemmt. Somit beeinflussten diese Substanzen die Atmungsfermente nicht.

Wegen ihres Gehaltes an Stickstoff und organischer Substanz erhöht Lipaselösung die Ruheatmung der saprophytischen Mycobakterien und ermöglicht sogar eine geringe Zellvermehrung, wie aus dem Anstieg von Atmung, Bakterienzahl und Trockengewicht hervorgeht. Die Atmungsgröße „ruhender“ Bakterien in Gegenwart von Lipase war bei Versuchsbeginn schon fast doppelt so groß wie die der Kontrollkultur. Die Bakterien nutzten das Ferment-Präparat sofort als Stickstoffquelle aus, während bei den Wachstumsversuchen die Atmung in Gegenwart von Lipase zunächst gegenüber der Kontrolle stark zurückblieb, um dann schnell anzusteigen.

Die endogene Atmung von *Mycobact. lacticola*, d. h. ohne Zusatz eines Kohlenhydrates, betrug bei gleicher Bakterienzahl ungefähr ein Viertel der Atmung in Gegenwart von Glucose. Die Atmung in Anwesenheit von Lipase war ohne Glucose zunächst viermal so stark, mit Glucose doppelt so stark wie die der Kontrolle. Unter dem Einfluß von Lipase verlief also die endogene Atmung in gleicher Weise wie bei Glucose-Zusatz. Außerdem stiegen die Atmungsgrößen in Gegenwart der Lipaselösung noch an.

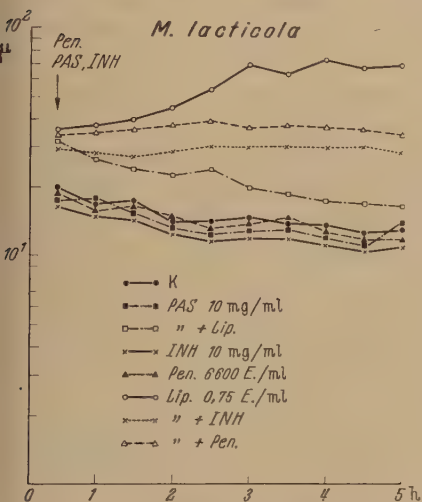


Abb. 12. Wirkung von Antibioticis, Chemotherapeuticis und Lipase auf die Atmung „ruhender“ Zellen von *Mycobact. lacticola*

Mycobact. phlei verhielt sich ähnlich.

„Ruhende“ Zellen verloren in kurzer Zeit ebenfalls ihre Säurefestigkeit. Da sich die Bakterien aber, sobald sie in die Lipaselösung kamen, zu

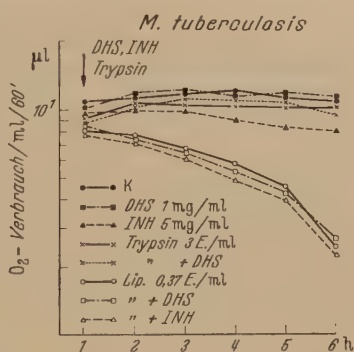


Abb. 13. Einfluß von DHS, INH, Lipase und Trypsin auf die Atmung „ruhender“ Zellen von *Mycobact. tuberculosis*, Typus humanus

vermehrten begannen, besteht die Möglichkeit, daß der Verlust der Säurefestigkeit auf wachsende Zellen beschränkt ist. Hiergegen spricht jedoch, daß *Mycobact. tuberculosis* unter dem Einfluß von Pankreaslipase ebenfalls die Säurefestigkeit verliert, obgleich im Ruhezustand in Gegenwart von Lipase (im Gegensatz zu den saprophytischen Mycobakterien) keine Vermehrung der Zellen eintritt. Es kommt sogar zu einem stärkeren Atmungsabfall. PRINA (1952) stellte gleichfalls einen Verlust der Säurefestigkeit nach 3—15stündigem Kontakt mit Pankreaslipase bei „ruhenden“ *Mycobact. tuberculosis*-Zellen fest.

Während bei *Mycobact. lacticola* die Atmung in Gegenwart von Antibioticis ebenso wie bei unbehandelten Zellen verlief, nahm die Atmungsgröße bei Zusatz von Lipase + Antibioticum, im Gegensatz zu Lipase allein, nicht zu. Es trat weder eine Zellvermehrung ein, noch sank die Atmung ab (Abb. 12). Demnach befand sich nur ein Teil der Zellen in der Wachstumsphase; diese wurden in ihrer Entwicklung gehemmt, während die „ruhenden“ Zellen nicht angegriffen wurden. Bei der Kombination

PAS + Lipase sank die Atmungskurve etwas ab. Auch unter dem Einfluß von Trypsin stieg die Atmung an, da der Stickstoff des Präparates ausgenutzt wurde. Gleiche Ergebnisse wurden bei *Mycobact. phlei* erzielt. — Bei *Mycobact. tuberculosis* wurde die Atmung durch 0,37 Lipase-E/ml wesentlich reduziert (Abb. 13). Diese Lipase-Konzentration kann hier als bactericid angesprochen werden. Weder DHS- noch INH-Zusätze vermochten die Lipasewirkung zu steigern. Trypsin beeinflußte im Gegensatz zu Lipase die Atmung nicht. Es ergibt sich aus diesem Versuch, daß hohe Lipase-Konzentrationen auf *Mycobact. tuberculosis*, Typus *humanus*, bactericid wirken.

Untersuchungen mit „ruhenden“ Zellen von Staphylococcus aureus

Da Pankreaslipase bereits auf wachsende Zellen von *E. coli* wirkungslos blieb, wurden nur die *Staph. aureus*-Stämme für die Versuche mit „ruhenden“ Bakterien herangezogen. Die 18-Std Kulturen wurden abzentrifugiert, gewaschen und unverdünnt in 0,5% Glucose + Phosphatpuffer, pH 7,2, aufgenommen.

Zusatz von 1 E Pen./ml beeinflusste die Atmung der „ruhenden“ Zellen des sensiblen *Staph. aureus*-Stammes in keiner Weise. Trypsin dagegen steigerte in einer Konzentration von 3 E/ml die Atmung, während es in der wachsenden Kultur die Atmung hemmte. Das Trypsin wird also im Stoffwechsel der „ruhenden“ Zellen ausgenutzt. Gegenätzlich hierzu wirkte die Lipaselösung. Lipase + Penicillin ergaben den gleichen Kurvenverlauf; die Wirkung ist hier allein der Lipaselösung zuzuschreiben. Nachdem die Atmungsgrößen zunächst bis zum 5fachen der Kontrollkultur anstiegen, fielen sie wie bei Wirkung einer bactericiden Substanz stark ab und lagen in 5 Std tiefer als bei der Kontrolle. Vielleicht läßt sich das Verhalten der Zellen in der Lipaselösung damit erklären, daß in den ersten Stunden die organische Substanz veratmet wurde, und dann ein bactericid wirkender Faktor des Lipase-Konzentrates zur Wirkung kam. Nach diesem Versuch mit „ruhenden“ Staphylokokken sind die Wirkungsweisen von Lipase- und Trypsinlösung keineswegs gleich, obwohl im Warburg-Versuch beide Fermentlösungen auf wachsende Zellen dieses Stammes ähnlich wirkten. Die „ruhenden“ Zellen des resistenten *Staph. aureus*-Stammes, die sich in der Lipaselösung befanden, atmeten 4mal stärker als die der Kontrollkultur, und sie vermehrten sich. Durch Zusatz von Penicillin wurde die Vermehrung kurzfristig, entsprechend der Wirkung des Penicillins gegenüber diesem Stamm, zunächst gehemmt und stieg danach wieder an. Die Zellen adaptierten also sehr schnell.

Der Salzeinfluß auf „ruhende“ Mycobakterien

Zu der „ruhenden“ *Mycobact. lacticola*-Kultur wurden als Salze 0,25 mol LiCl und 0,12 mol BaCl₂ zugesetzt. LiCl hatte nicht den geringsten Einfluß auf die Atmung „ruhender“ Zellen, und auch seine

Kombination mit Penicillin blieb ohne Wirkung. Dagegen wirkte BaCl_2 in einer Konzentration von 0,12 mol bereits etwas atmungshemmend. Die Kombination mit Penicillin verstärkte diese Hemmung nicht. Ein Vergleich der „ruhenden“ mit der wachsenden *Mycobact. lacticola*-Kultur in Gegenwart von BaCl_2 läßt erkennen, daß es sich bei BaCl_2 um ein toxisches Salz handelt, das auf in Vermehrung befindliche *Mycobakterien* in einer Konzentration von 0,12 mol wachstumshemmend wirkt und bei „ruhenden“ Keimen sogar zu einer Atmungshemmung führt.

Besprechung der Versuchsergebnisse

Von der Überlegung ausgehend, daß Antibiotica in die Zelle eindringen müssen, um ihre Wirkung entfalten zu können, wurde die Frage gestellt, ob durch Änderung der Bakteriengrenzschicht die Aktivität der Antibiotica erhöht werden kann. Da bei den *Mycobakterien* die große Anzahl lipophiler Gruppen in der Grenzschicht den Eintritt von Antibioticis erschwert, wurde hauptsächlich diese Bakteriengruppe für die Versuche herangezogen.

Mit Hilfe von Pankreaslipase kann, wie die Ergebnisse zeigen, ein Verlust der Säurefestigkeit herbeigeführt werden, d. h. der Lipoidgehalt wird verändert. Lipase verstärkt die Wirkung eines Antibioticums. So wirkt Penicillin (in höherer Konzentration), demgegenüber *Mycobact. lacticola* sich als resistent erweist, in Gegenwart von Pankreaslipase „bedingt bactericid“, d. h. nach einer Latenzphase — in der ein Eingriff in den Mononucleotid-Stoffwechsel bei gleichzeitig unbeeinflusster Kernteilung und Bildung von Riesenzellen stattfindet (TULASNE 1949) — neigt sich die Atmungskurve und fällt geradlinig ab, da die Bakterien nicht mehr lebensfähig sind. Auch PAS, INH und DHS wirken in Gegenwart von Lipase stärker. Es wird eine Bacteriostase bzw. „bedingte Bactericidie“ verursacht, wobei ein Bacteriostaticum nur den Teilungsapparat der Zelle beeinträchtigt und die Vermehrung unterbindet, während eine bactericid wirkende Substanz auch die Atmungsfermente beeinflußt und das Bacterium abtötet.

Hinsichtlich der Wirkungsweise der Antibiotica in Gegenwart von Pankreaslipase zeigen bereits *Mycobact. lacticola* und *Mycobact. phlei* auf Grund ihrer unterschiedlichen Säurefestigkeit gewisse Differenzen. Diese sind noch ausgeprägter im Vergleich zu *Mycobact. tuberculosis*. Abgesehen davon, daß das Lipase-Präparat bei dem Bacterium weniger verträglich ist, erhöht schon eine Konzentration von 0,045 Lipase E/ml die Antibiotica-Aktivität gegenüber einem DHS-, INH- und PAS-resistenten *Mycobact. tuberculosis*-Stamm. Das *Mycobacterium* mit der stärksten Säurefestigkeit ist als am empfindlichsten gegenüber Pankreaslipase und deren Kombination mit Antibioticis, was durch die hohe Lipoideinlagerung zu erklären ist.

Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung von CHAPLIN (1952), daß ein Stamm von *Serratia marcescens*, der an eine hochkonzentrierte Lösung von Alkyldimethyl-benzylammoniumchlorid adaptiert wurde, durch Zusatz von Lipase gegenüber dem quartären Ammoniumsalz wieder empfindlich wurde. Der Verfasser nimmt an, daß die resistenten Zellen einen höheren Lipoidgehalt besitzen. Hier könnte vielleicht eine Parallele zu den eigenen Versuchen gezogen werden. — Gleichzeitig soll erwähnt werden, daß nach KIRBY u. DUBOS (1947) die Penicillin-, und nach FISHER (1948) die Streptomycin-Aktivität gegenüber *Mycobact. tuberculosis* in Gegenwart von „Tween 80“ gesteigert wird. Die Verfasser weisen darauf hin, daß „Tween 80“ die Oberflächenaktivität verändert, ohne in die Zelle einzudringen. „Tween 80“ konnte bei eigenen Versuchen nicht zum Substrat hinzugefügt werden, da Lipase das „Tween 80“ spaltet und die frei werdende Ölsäure das Wachstum der Mycobakterien hemmt (BOZZETTI 1950).

Pankreaslipase beeinflusste die Aktivität von Antibioticis gegenüber „ruhenden“ Zellen nicht, da die untersuchten Substanzen nur Bakterien angreifen, die sich in der Wachstumsphase befinden.

Die Anwendung eines Ferment-Glycerin-Präparates zeigte, daß auch hier die Lipase — in Verbindung mit Glycerin — für die tuberculostatische Wirkung herangezogen werden muß, da geringe Konzentrationen des Präparates (Verdünnung 1:40) die Aktivität des Streptomycins steigern. Versuche mit der reinen Lipaselösung brachten analoge Ergebnisse. Dem Glycerin, das bereits von SARTORY u. a. (1947) für morphologische Veränderungen des *Mycobact. tuberculosis* verantwortlich gemacht wurde, kann bei geeigneter Konzentration eine antibakterielle Bedeutung zugesprochen werden. Eigene Untersuchungen ergaben keinen Beweis für einen Verlust der Säurefestigkeit. Gerade unter dem Einfluß von Glycerin waren stark säurefeste, gequollene Zellen neben säurefesten Granula und nicht säurefesten Stäbchen zu beobachten. Das Trypsin, das im Ferment-Glycerin-Präparat enthalten ist, wirkt selbst in einer Konzentration von 9 E/ml weder auf die pathogenen, noch auf die saprophytischen Mycobakterien wachstumshemmend, so daß vorwiegend die Lipase, neben dem Glycerin, gegenüber Mycobakterien wirkt.

Ein Vergleich der Ergebnisse, die mit Lipase + Antibiotica erzielt wurden, mit den mit Neutralsalzen + Antibiotica gewonnenen, weist auf die größere Kombinationswirkung der Lipaselösung hin. Während eine Kombination von Lipase mit der höchsten Konzentration der Antibiotica „bedingt bactericid“ wirkt, erfolgt unter dem Einfluß der verschiedenen Salze in Gegenwart der Antibiotica nur eine Bacteriostase. — Bei allen untersuchten Salzen war ein Zusammenwirken mit dem Antibioticum zu beobachten, wobei dem Salz aber wohl die stärkere Hemmwirkung zuzuschreiben ist, da es allein schon die Wachstumsgeschwindigkeit verzögert und den Teilungsprozeß unterbindet, so daß abnorm vergrößerte Zellen entstehen, Involutionsformen, die nach RIPPEL-BALDES u. BUSCH (1954) reich an DNS sind. Durch das gleichzeitige

Angreifen der Antibiotica in hoher Konzentration kommt es zu einer additiven Wirkung.

Während Lipase auf Mycobakterien spezifisch wirkt, und seltsamerweise nur penicillinsensible Staphylokokken durch Lipase angegriffen werden, ist die Kombinationswirkung Neutralsalze-Antibiotica auch bei „normalen“ Bakterien zu finden. Dieser Synergismus tritt nur bei hohen Konzentrationen auf, so daß ihm keine besondere Bedeutung zukommt.

Zusammenfassung

1. Pankreaslipase verändert bei saprophytischen und pathogenen Mycobakterien die Säurefestigkeit. Das Ferment wirkt auf wachsende Saprophyten wachstumsfördernd, auf pathogene Mycobakterien wachstumshemmend.

2. Laufende quantitative Bakterienbestimmungen ergaben für saprophytische Mycobakterien eine S-förmig verlaufende Kurve. Sie wird durch verschiedene Antibiotica und Chemotherapeutica verändert.

3. Sowohl im Reagensglasversuch als auch in der Warburg-Apparatur wurde die Aktivität der Antibiotica Penicillin und Streptomycin und der Chemotherapeutica Isonicotinsäurehydrazid und p-Aminosalicylsäure gegenüber Mycobakterien durch Pankreaslipase gesteigert. Die größte Aktivitätssteigerung ist gegenüber *Mycobact. tuberculosis* festzustellen, das im Vergleich zu *Mycobact. lacticola* und *Mycobact. phlei* am stärksten säurefest ist. Die Aktivitätssteigerung muß auf die Wirkung der Lipase zurückgeführt werden.

4. Auch bei einem Ferment-Glycerin-Präparat zeigte sich die aktivitätssteigernde Wirkung der Lipase durch Testung der Einzelkomponenten des Präparates in Kombination mit Antibioticis. Das Präparat hatte in hoher Konzentration eine tuberculostatische Wirkung, die einerseits der Lipase, andererseits dem Glycerin zuzuschreiben ist. Das im Präparat vorhandene Trypsin wirkt nicht wachstumshemmend, sondern indirekt wachstumsfördernd.

5. „Ruhende“ Zellen der Saprophyten vermehren sich, wenn auch langsam, in Gegenwart von Pankreaslipase (SCHUCHARDT), da sie reich an Stickstoff ist. Die Antibiotica wirken auf die sich vermehrenden, nicht auf die „ruhenden“ Zellen. — Bei den pathogenen Mycobakterien wirken hohe Konzentrationen der Lipase bactericid auf „ruhende“ Zellen.

6. „Normale“ Bakterien werden durch Pankreaslipase nicht beeinflusst, außer penicillinsensiblen Staphylokokken, die nicht nur im Wachstum, sondern auch im Ruhezustand gehemmt werden.

7. Überoptimale Konzentrationen der Alkalichloride NaCl und LiCl und der Erdalkalichloride $MgCl_2$, $CaCl_2$ und $BaCl_2$ beeinflussen die Morphologie und das Wachstum von Mycobakterien und „normalen“

Bakterien. Den Erdalkalisalzen ist eine stärkere Hemmungswirkung zuzusprechen (entquellende Wirkung der Erdalkalisalze).

8. Bei Kombination unterschwelliger Dosen der Salze mit Antibiotica ergibt sich ein Zusammenwirken der Einzelkomponenten. Die quellenden und entquellenden Kationen verhalten sich in Verbindung mit dem Chlor als Anion ähnlich. Bacteriostase tritt nur bei höchster Antibiotica-Konzentration auf.

9. „Ruhende“ Zellen werden nicht durch Salze angegriffen; nur BaCl_2 wirkt auf Grund seiner Toxizität wachstums- und atemungshemmend.

Herrn Prof. Dr. A. RIPPEL-BADLES, möchte ich an dieser Stelle meinen aufrichtigsten Dank für das rege Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte, aussprechen.

Ausgeführt mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Literatur

- ABDERHALDEN, R.: Fermentforschung **17**, 583 (1945). — ANDERSON, R. J.: J. Biol. Chem. **90**, 45 (1931); Fortschritte der Chemie org. Nährstoffe **3**, 145 (1939). — ARONSON, J. D. u. a.: Soc. Exper. Biology, Proceedings **80**, 259 (1952).
- BARKULIS, J. L.: J. Bacter. **65**, 337 (1953). — BARTRAM, H.: Zbl. Bakter. I. Abt. Orig. **155**, 338 (1950). — BERGEL, S.: Beitr. Klin. Tbk. **111**, 4. Heft, 394 (1918). — BOZZETTI, E.: Boll. soc. ital. biol. sperm. **28**, 1087 (1952). — BUREACZWESKA, M.: Med. deswiadczalnia Microbiol. **4**, 39 (1952) Warschau.
- CHAPLIN, C. F.: J. Bacter. **63**, 453 (1952). — CHURCHMAN, J. W.: J. of Exper. Med. **16**, 221 (1912). — CLAUS, D.: Arch. Mikrobiol. **25**, 10 (1956).
- DIRR, K.: Quant. Arbeiten in der Klinik **145**. Müller u. Steinicke, München 1942. — DUBOS, R. J.: J. of Exper. Med. **83**, 409 (1946).
- FISHER, M. W.: Amer. Rev. Tbc. **57**, 58 (1948). — FISHER, M. W., and W. F. KIRCHHEIMER: J. Bacter. **62**, 319 (1951). — FITZGERALD, R. J., and F. BERNHEIM: J. Bacter. **54**, 68 (1947). — FRANKE, W., u. A. SCHILLINGER: Biochem. Z. **316**, 313 (1944).
- GALE, G. R.: J. Bacter. **63**, 273 (1952). — GILLISSEN, G.: Arch. Hyg. **137**, 159 (1953).
- HAGEMANN, P. K. H.: Münch. med. Wschr. **1937**, 76. — HEINZEL, E.: Arch. Mikrobiol. **15**, 119 (1950). — HIRSCH, J.: Revue Faculté Sci. Univ. d'Istanbul; Nouvelle Série **1**, 40 (1936); Enzymologia **4**, 94 (1937). — HIRSCH, J., and S. DOSDOGRU: Arch. of Biochemistry **13/14**, 213 (1947). — HIRSCH, J.: Naturwissenschaften **39**, 525 (1952). — HOHN, J.: Zbl. Bakter. I. Abt. Orig. **145**, 145 (1939/40).
- JANKE, A.: Arbeitsmeth. d. Mikrobiol. I. Bd. 2. Aufl. Dresden u. Leipzig (1946). — JENSEN, H. L.: Proc. Lin. Soc. N.S. Wales, **59**, 18 (1934).
- KAHN, H.: Ergeb. Biol. **1**, 380 (1926). — KIRBY, W. M., and R. J. DUBOS: Soc. Exper. Biol. Proc. **66** 120 (1947). — KLEIN, G.: Handbuch der Pflanzenanalyse. Wien 1932. — KNAYS, G.: J. Bacter. **51**, 113 (1946). — KRAUT, H., u. H. BURGER: Z. physiol. Chem. **253**, 105 (1938).
- LEMBKE, A., u. H. RUSKA: Klin. Wschr. **1940**, 217.
- MANKIEWICZ, M.: Canad. J. Med. Sci. **30**, 106 (1952). — MONOD, J.: Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Paris 1942.
- PÈJU, u. RAJAT: Zbl. Bakter. I. Abt. Referate. **42**, 11 (1909). — PESCHKE, J., u. H. WEBER: Beitr. Klin. Tbk. **111**, Heft 4, 394 (1954). — PLOTHO, v. O.:

Arch. Mikrobiol. **13**, 93 (1942). — PORTER, K. R., and D. YEGIAN: J. Bacter. **50**, 563 (1945). — PRATT, R., J. DUFRENOY and L. STRAIT: J. Bacter. **55**, 75 (1948). — PRINA, C.: Rend. Cl. Sci. Mat. et Nat. **85**, 412 (1952) Istituto Lombardo, Milano; Boll. Ist. sierot. Milanese **32**, 124 (1953); Archivio Sci. Med. **96**, 547 (1953) Torino.

RADETZKI, W.: Z. Hyg. **128**, Heft 6/7, 1948. — RADLER, F.: Arch. Mikrobiol. **22**, 335 (1955). — RIPPEL-BALDES, A.: Grundriß der Mikrobiologie. 3. Aufl. Berlin, Göttingen und Heidelberg 1955. — RIPPEL-BALDES, A., u. G. BUSCH: Nachr. Akad. Wiss. Göttingen Nr. 4, 23, IIb. Biolog. Physik. Chem. Abt. (1954).

SARTORY, A., J. MEYER et J. M. LANGE: Bull. Acad. Med. **131**, 19 (1947). — C. r. Acad. Sci (Paris) **224**, 607 (1947). — SCHADE, A. L.: J. Bacter. **58**, 811 (1949). — SCHULER, W.: Experientia **2**, 316 (1946); **3**, 110 (1947). — SORKIN, E.: Experientia (Basel) **7**, 64 und 257 (1951). — SPEYER, E.: Arzneimittelforsch. **3**, 309 (1953). — SMITH, D. G., and S. A. WAKSMAN: J. Bacter. **54**, 253 (1947). — SUMNER, J. B., and K. MYRBÄCK: The Enzymes **1**, Teil 1, 390. New York 1950.

TULASNE, R.: C. r. Soc. Biol. (Paris) **143**, 286 (1949).

UMBREIT, W. W., R. H. BURRIS and J. F. STAUFFER: Manometric Techniques and Tissue Metabolism. Minneapolis 1951. — UMBREIT, W. W.: Pharmacol. Rev. **5**, 275 (1953).

VESCOVI, M.: Medicina Sperm. **21**, 225 (1949). — VOGEL, L., u. P. LAEVERENZ: Z. physiol. Chem. **234**, 176 (1935). — VOSS, H.: Arch. Mikrobiol. **18**, 101 (1952).

WAGNER, W. H.: Arb. aus dem Paul-Ehrlich-Institut, Heft **49**, 98 (1951). — WARBURG, O.: Über den Stoffwechsel von Tumoren, Berlin 1926. — WILLSTÄTTER, R., u. E. WALDSCHMITZ-LEITZ: Z. physiol. Chem. **161**, 181 (1926). — WOLF, H. J., u. K. DZIUBA: Medizinische Nr. 50, 1619 (1953).

YEGIAN, D., and R. J. VANDERLINDE: J. Bacter. **54**, 777 (1947). — ZELLER, E. A.: Experientia (Basel) **8**, 349 (1952).

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen)

Untersuchungen über die Verbreitung von Streptomyceten in Naturböden *

Von

GERHARD JAGNOW

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. Juli 1956)

Die Streptomyceten sind sowohl in Unterwasserböden (KRASILNIKOW 1953, WEEKS 1945) als auch in Landböden ein stetiger, oft stark hervortretender Bestandteil der Mikroflora. In dieser Arbeit wurde die Verbreitung der nach BALDACCI (1953, 1954) aufgestellten Streptomyceten-gruppen in der oberen Bodenschicht kulturell unbeeinflusster, bodenkundlich und pflanzensoziologisch charakterisierter Standorte untersucht.

Einen ähnlichen Versuch unternahmen HORVATH u. Mitarb. (1943) im Hinblick auf das Vorkommen antagonistisch wirksamer Stämme in verschiedenen Pflanzengesellschaften, sie fanden jedoch zwischen den systematisch nicht genauer aufgegliederten Isolaten und ihrer Herkunft keinen Zusammenhang. PFENNIG (1952) teilte anhangsweise den Actinomycetengehalt einiger Erdproben aus verschiedenen Pflanzengesellschaften mit, wodurch die vorliegenden Untersuchungen angeregt wurden. Die Arbeit von STAPP (1953) gab keine Anhaltspunkte für die Verbreitung der isolierten Stämme.

Die Keimzahl der Bodenproben wurde mit dem Plattengußverfahren ermittelt, das trotz der von SKINNER u. Mitarb. (1952) wieder herausgestellten Fehlerquellen (mikroskopische Zählungen ergaben 40—50fach höhere Werte) relativ Menge und Zusammensetzung der Streptomyceten-Populationen verschiedener Erdproben hinreichend aufdeckt. Hierbei wurde zur Anreicherung Glycerin-Glykokoll-Agar nach LINDENBEIN (1952) verwendet, auf dem verschiedene Stämme meist unterschiedlich gefärbt wachsen, sich makroskopisch unterscheiden und auszählen lassen. BENEDICT u. Mitarb. (1955) fanden einige Stämme, die Glykokoll nicht verwerteten, und empfahlen statt dessen I(-)Arginin als geeignetere Stickstoffquelle. Doch dürften mit dem verwendeten Nährboden alle Gruppen und wesentlichen Vertreter erfaßt worden sein.

Die Bodenproben wurden aus verschiedenen Teilen Südwestdeutschlands und der Schweiz in den Jahren 1953 und 1954 gesammelt; einige stammten aus der Umgebung von Göttingen.

* Teilergebnisse der Dissertation „Untersuchungen über die Verbreitung und Ökologie von Streptomyceten in Naturböden“, Göttingen, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät 1956.

I. Beschreibung der Standorte

Die Pflanzenbestände der Probeflächen wurden mit Hilfe der pflanzensoziologischen Exkursionsflora von OBERDORFER (1949) und persönlicher Hinweise dieses Autors in das von BRAUN-BLANQUET (1928) begründete System der Pflanzengesellschaften eingeordnet. Nähere Angaben mit Artenlisten in der Originalarbeit.

1. Die Fels- und Trockenrasenstandorte

1. Mesobrometum zwischen Göttingen und Nikolausberg. Etwa 30 m hohe, 20° nach W geneigte Böschung auf Muschelkalk, kaum beweideter niederer Rasen mit *Brachypodium pinnatum*, *Koeleria pyramidata* und *Bromus erectus*. — 2. Mesobrometum nordöstl. Reiffenhausen, Rand eines Kalksteinbruches, sehr flachgründiges, schwach SW-exponiertes, ungenutztes Ödland. — 3. Mesobrometum nordöstlich Werleshausen, SW-exponierter, unbeweideter, lückiger, niederer Rasen auf Muschelkalk mit viel Wachholder. — 4. Mesobrometum, Spitzberg bei Tübingen. Alte Weinbergterrasse auf Kalk, SO-exponierte Selbstberasung. — 4a. 300 m von 4. entferntes Mesobrometum am Waldrand mit viel *Anthericum ramosum*. — 5. Mesobrometum, 70° n. S geneigte Lößböschung eines Hohlweges nördlich Grötzingen bei Karlsruhe. *Brachypodium pinnatum*-Rasen, bald von Brombeer-Ligustergebüsch überwachsen. — 6. Mesobrometum auf Löß. Terrassenstreifen auf der Südseite des Badberges im Kaiserstuhl. Einschüriger *Brachypodium pinnatum*-Rasen. — 7. Mesobrometum auf der Nordseite des Badberges, in Gipfelnähe, Subassoziation mit *Genista sagittalis* und *Stachys officinalis* (v. ROCHOW, 1951). Im Unterwuchs viel Moose, Boden lößfrei, oberflächlich entkalkt.

Es folgen einige flachgründige, meist locker besiedelte Standorte auf basischem Gesteinsuntergrund, die nach OBERDORFER (1950) einem Unterverband Blaugrasreicher Gesellschaften (Seslerio-Bromion) angehören (Nr. 8—15).

8. Xerobrometum, 30° geneigter Südhang des Badberges (Kaiserstuhl) auf Essexit-Gabbro. Als besonders extremer Standort durch xerotherme Charakterarten wie *Stipa pennata*, *Globularia Willkommii* und *Teucrium montanum* ausgezeichnet, hier trockenste und flachgründigste Subasso. mit *Artemisia campestris*, *Andropogon Ischaemum* und *Aster Linosyris* (v. ROCHOW, 1951). — 9. Eremitagefelsen östlich Dornach bei Basel. Nur mit Kräuterpolstern lückig bewachsener steiler Südhang auf Jurakalk. — 10. Isteiner Klotz (Kr. Lörrach): steiler, locker besiedelter Westhang. — 11. Silzberg nördlich Grötzingen bei Karlsruhe: locker bewachsener, steiler SW-Hang auf Kalk. — 12. Seslerio-Festucetum auf dem Treifelbergfelsen (Reutlinger Alb). — 13. Seslerio-Festucetum am Sachsenstein (bei Bad Sachsa) auf Gipsschotter am Felsfuß, 45° nach W geneigt, locker besiedelt mit *Gypsophila fastigiata*. — 14. Seslerio-Festucetum auf dem Bilstein nordöstl. vom Meissner, 20° südexponierter Trockenrasen auf Diabas. Benachbart tiefgründigerer *Brachypodium pinnatum*-Rasen (Mesobrometum). — 15. Sesleria-Kalkschuttgesellschaft im Gregor-Kraus-Naturschutzgebiet bei Karlstadt am Main. Steile, SW-exponierte Schotterhalde. — 16. *Carex humilis*-*Stipa*-Assoziation (Steppenrasen-Verband, Festucion valesiacae: BRAUN-BLANQUET, 1936) im Gregor-Kraus-Naturschutzgebiet, ebene Wellenkalkhochfläche. Beschreibung beider Assoziationen bei VOLK (1938). — 17. Kalkschutthalde am Isteiner Klotz (Kr. Lörrach), 20° nach W geneigt, zu 50 % besiedelt: *Scrophularia canina* — *Epilobium Dodonaei*-Assoziation.

Die Proben Nr. 18—22 stammen aus der Umgebung von Birkenfeld/Nahe von mäßig sauren Böden (pH 5,1—5,4).

18. Feldrainböschung, 45° nach O geneigt: trockene Glatthaferwiese. — 19. Denkmal bei Nohen, Trockenrasen auf Melaphyr, Südhang. — 20. Lützelkopf, Südhang: Niederwaldlichtung mit dominierendem *Scleranthus perennis* und *Sedum album*, Sedo-Scleranthion BRAUN-BLANQUET (1949) (zitiert nach OBERDORFER, 1950). — 21. Am Faulenberg, ähnlicher Sedo-Scleranthion Standort auf Melaphyr, schwach nach SSW geneigt. — 22. Calluneto-Genistetum Nagelkopf bei Eckelhausen: harte, loker mit *Calluna vulgaris* und *Genista pilosa* besiedelte Felskuppe. — 23. Corynephorum aus dem Binnendünengebiet bei Heidelberg: Exerzierplatz bei Sandhausen, zu 60% bedeckte, ebene Silbergrasflur (s. VOLK, 1931). — 24. Caricetum gracilis, Schlankseggenried am Krummengraben im Kaiserstuhl auf Löß.

2. Waldstandorte

25. Pruneto-Fraxinetum (Hartholzauwald) der Rheinebene bei Freiburg (s. OBERDORFER, 1953). Angrenzend Erlenbruchwald. — 26. Weiden-Pappelauald (Saliceto-Populetum) bei Breisach: periodisch überfluteter Schwemmboden, *Urtica*-Facies. — 27. Krüppelniederwald am SW-Hang bei Bahnhof Heimbach (Kr. Birkenfeld) auf Melaphyr.

Die vorige und die folgenden Proben (Nr. 28—32) entstammen wärmeliebenden Trockenwäldern der Ordnung der Quercetalia pubescentis-sessiliflorae:

28. Querceto-Lithospermetum auf der Wellenkalkhochfläche des Gregor-Kraus-Naturschutzgebietes. — 29. Pineto-Cytisetum bei Geisingen a. d. Donau: Floristisch reichhaltiger Kiefern-trockenwald auf Kalk an Südhang (*Polygala Chamaebuxus* u. a.). — 30. Kiefernforst auf steilem Osthang (Kalk) bei Werleshausen a. d. Werra. — 31. Flaumeichenbuschwald-Hecke am Fuß des Badberges im Kaiserstuhl. — 32. Querceto-Lithospermetum am Isteiner Klotz (Westhang) mit wenig Unterwuchs.

Zum Vergleich wurden einige Buchenwaldstandorte (Fagion) untersucht (Nr. 33—39):

33. Krautreiches Kalk-Fagetum im Göttinger Wald (Pleß-Forst) bei 380 m Höhe, ebene Fläche. — 34. Acereto-Fraxinetum (Schluchtwald), steiler NO-Hang am Kalkabbruch des Hünstollens im Göttinger Wald: Buchenaltbestand mit viel *Lunaria rediviva*. — 35. Fagetum seslerietosum, Blaugras-Buchenwald der Schwäbischen Alb am Traifelbergfelsen, schwach nach W geneigt auf flachgründigem Jurakalk. — 36. Luzula-Fagetum des Kaiserstuhls (v. ROCHOW, 1951): Flacher, oberflächlich entkalkter Westhang. — 37. Strauch-Fagetum im Kaiserstuhl (v. ROCHOW, 1951), dem trockenheitsliebenden „Cariceto-Fagetum“ (LOHMEYER, 1955) zugehörig. 15° geneigter SO-Hang. — 38. Abieto-Fagetum im Höllenta (Schwarzwald), oberhalb der Ravennabrücke auf Granit, sickerfeucht, steil nach W geneigt. — 39. Luzula-Fagetum auf Buntsandstein bei Schloß Berlepsch (Kr. Wittenhausen).

3. Alpine Standorte

40. Felsspaltgesellschaft im Maderaner Tal (Kanton Uri) auf Urgestein, südexponiert. Boden sehr humos, schwach sauer. — 41. Gletschermehlablagerung des Kerstelenbachs im Maderaner Tal. — 42. Alpine Borstgrasgesellschaft (Nardion) auf dem Sustenpaß in 2200 m Höhe. Sickerfeuchter SW-Hang mit einigen Fettweidearten. — 43. Beerstrauchheide in NO-Exposition an der Susten-Paßstraße in 2100 m auf Rohhumus.

4. Die Bodentypen

Die Böden der Standorte ließen sich in das von KUBIENA (1953) aufgestellte System einordnen. Die flachgründigen Trockenrasen auf Kalkfels (8—10, 12) entwickeln als Ausgangsbodenbildung die Protorendsina. Sie zeichnet sich durch

nur schwach zersetzte organische Reste und fehlende Krümelung aus. Mit fortschreitender Verwitterung entstehen daraus infolge eines höheren Tonanteils und größerer biologischer Aktivität Böden mit Krümelstruktur, die Mullartige Rendsina und die Mullrendsina (übrige Kalktrockenrasen sowie die Trockenwaldstandorte 30 und 31).

Ein ähnlicher Standort mit für Rendsinaböden bezeichnender Moderhumusbildung auf basenreichem Silikatgestein (Pararendsina) ist der Bilstein (14). Die Trockenrasen aus der Umgebung Birkenfelds (19—21) mit humusreichem, schwach saurem A/C-Profil dürften ebenfalls einer mullreichen Pararendsina entsprechen.

Schotterhalden auf Kalk oder Gips sowie frisch besiedelte Lößböschungen sind unentwickelte, humusarme Rohböden: Kalk- bzw. Löß-Syroseme (5, 11, 13, 15 u. 17).

Der Heidestandort auf dem Nagelkopf (22) hat schwer verwitterndes, basenarmes Eruptivgestein als Unterlage sowie eine saure Humusform (p_H 4,8) und ist zu den Rankern, einer auf sauren Böden den Rendsinen analogen Entwicklungsreihe von A/C-Böden, zu stellen.

In Silikat-Felsspalten (40) bildet sich ein Protoranker mit überwiegend aus Kleintierlosung bestehendem, gut zersetztem A-Horizont auf fast unverwitterter Unterlage (KUBIENA, 1953).

Weitere Bodenentwicklung führt in den Hochlagen entweder zur Alpinen Rasenbraunerde (42) oder unter Rohhumusbildung bei geringer Tiefenverwitterung zum Podsolranker (43).

Die Waldböden sind meist Braunerden. Nach Basenreichtum und Ausgangsgestein ergeben sich drei Untertypen: 1. Kalkbraunerde mit optimalem, gut gekrümeltem Mullhorizont (28, 29, 32—35). — 2. Eutrophe Braunerde auf basenreichen Gesteinen (27, 36, 37). — 3. Oligotrophe Braunerde auf basenarmem Ausgangsgestein: Buntsandstein-Buchenwälder und Buchen-Tannenwald auf Granit (38, 39).

Einen nährstoffreichen Rohauboden, Rambla, mit fast neutraler Reaktion hat der periodisch überschwemmte Auwald am Rhein (26). Dauernd grundwasserbeeinflusste Gleyböden besitzen der bodensaure Hartholzauwald (25) und das Schlankseggenried auf Löß mit neutraler Reaktion (24).

II. Methodik

Bei der Bestimmung der Boden- p_H -Werte wurde die direkte Messung mit „Lyphan“-Indicatorpapier verschiedener p_H -Bereiche an der leicht mit dest. Wasser angefeuchteten Bodenkrume der ionometrischen Messung einer Aufschwemmung vorgezogen, da sie einen besseren Einblick in die eigentlichen Standortverhältnisse der Mikroorganismen gewährt.

Die Menge der organischen Substanz wurde mit der Schnellmethode nach SCHOLLENBERGER (1927) bestimmt (Oxydation mit Chromschwefelsäure und deren Rücktitration). Der C-Gehalt wurde nach der vorliegenden Eichkurve ermittelt und der Humusgehalt unter Annahme eines C-Gehaltes von 50% errechnet.

Von den Proben dreier Dauerstandorte wurde der Wassergehalt in Gewichtsprozenten bestimmt.

Die Keimzahlen und Anteile der Actinomyceten auf Gußplatten wurden mit einem möglichst wenig selektiven Bouillon-Agar Nährboden (0,5% Difco-Fleischextrakt, 0,25% Pepton, 0,5% NaCl) ermittelt; 5 Parallelplatten wurden je nach der zu erwartenden Keimzahl mit 1 ml einer auf $1 : 10^5$ bis $1 : 10^8$ verdünnten Aufschwemmung von 5 g frischem Boden beimpft und nach einer Woche Bebrütung bei 26° ausgezählt.

Entsprechende 5 Parallelplatten wurden mit Glycerin-Glykokoll-Agar nach LINDENBEIN (1952) gegossen. Nach Vorversuchen erwies sich dieser Spezialnährboden für die Trennung und Isolierung von Streptomycceten als der geeignetste, da Farbstoffe, die zu ihrer Unterscheidung und Einteilung wichtig sind, hier besser ausgebildet werden. Er wurde mit einer niedrigeren Verdünnungsstufe beimpft, so daß sich je Platte etwa 20—100 Kolonien entwickelten und für jeden Farbton die Anzahl der Kolonien notiert.

Außerdem wurden noch Platten mit Würze-Agar (50% Würze), beimpft mit einer Bodenaufschwemmung von 1 : 10³, gegossen und nach drei Tagen Bebrütung auf Pilzkolonien ausgezählt.

Der mittlere Fehler, aus den Streuungen der Parallelplatten errechnet, schwankte meist zwischen 10 und 20% und ist in den Tabellen unter „m.F.“ angegeben.

Von den Platten wurden so viele Stämme isoliert, als sich nach Farbe oder Form verschiedene, abimpfbare (versporete) Streptomyccetenkolonien in einer Gußserie fanden und so ein möglichst vollständiger Auszug der Streptomyccetenpopulationen verschiedener Standorte gewonnen. Diese Sammlungsstämme wurden ebenfalls auf Glycerin-Glykokoll-Agar, jedoch nach PFENNIG (1953) mit einem Zusatz von 2% Hefekochsaft, gehalten.

Jeder Stamm wurde gegen *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium lacticola* und *Aspergillus terreus* getestet.

Nach 7 d Vorkultur auf steril ausgestanzten Glycerin-Glykokoll-Agarscheibchen von 12 mm Ø bei 26° C wurden diese auf den Testnährboden, der die 24 Std in Bouillon vorkultivierten Testbakterien enthielt, aufgesetzt und die Hemmzonen nach 24 Std Bebrütung bei 26° C ausgemessen. Für *Bac. subtilis* und *Esch. coli* diente Bouillon-Pepton-Agar und für das sehr langsam wachsende *Mycobacterium lacticola* Pepton-Glucose-Agar (0,5% Pepton, 1,0% Glucose, 0,1% K₂HPO₄, 0,05% MgSO₄) als Nährboden. Letzteres wurde 3 d auf Lösung vorkultiviert und bis zur Ablesung des Testes weitere 3 d bebrütet. Der Bewuchs war auch dann nur als schwache Trübung sichtbar, doch ließen sich die Hemmzonen gut erkennen.

Für den Test mit *Aspergillus terreus* wurde ein Würze-Pepton-Glucosenährboden (abgewandelt nach WALLHÄUSSER, 1951) benutzt (20% Würze, 0,5% Pepton, 1,0% Glucose, 2,0% Agar, pH 7,0). Je Petrischale wurden 4 Streptomyccetenstämme so ausgestrichen, daß die vier Impfstiche zusammen ein Quadrat bildeten und 6 d bebrütet. Wachstum und Luftmycelentwicklung aller Stämme waren auf diesem Nährboden besonders gut. Der Pilz wurde als Sporensuspension aufgesprüht und drei weitere Tage bebrütet.

III. Untersuchung der Dauerstandorte

1. Jahresschwankungen der Keimzahl und des Actinomycetengehaltes

Halbtrockenrasen bei Nikolausberg

Die Keimzahl des Halbtrockenrasens bei Nikolausberg (Nr. 1, Abb. 1) zeigt je nach den Umweltbedingungen starke Schwankungen und kann dabei extrem hohe Werte erreichen (Juli 1953). Während der Sommermonate ist der Wassergehalt des Bodens begrenzender Faktor, wie ein Vergleich der Keimzahlkurven von 1953 und 1954 zeigt. Er hängt von den Niederschlägen und der Tiefgründigkeit des Profils ab. HOFF(1950) fand an einem flachgründigeren Trockenrasenstandort (Nr. 3) im Sommer 1944 etwa 8mal niedrigere Keimzahlen und eine trockenheitsbedingte

Depression, der im Mai das Hauptmaximum vorausging und im September ein erneuter Anstieg folgte.

Im hier untersuchten Fall entwickelte sich das Hauptmaximum 1954 nach einem fröhsommerlichen Tiefstwert im Spätsommer. Daß der sonst für diese Standorte charakteristische sommerliche Rückgang der Keimzahl bei genügender Bodenfeuchtigkeit ausbleibt, zeigt der eingipfelige Verlauf im Jahre 1953.

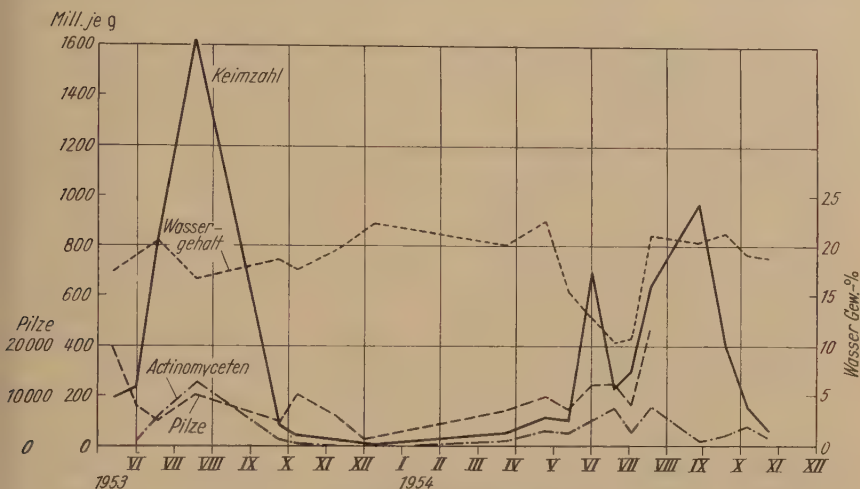


Abb. 1. Halbtrockenrasen bei Nikolausberg

Die Menge der Actinomyceten schwankt infolge ihres im Vergleich mit den Bakterien langsameren Wachstums weniger. Die Bodenbakterien reagieren auf Änderung von Umweltfaktoren mit schneller Vermehrung und plötzlichem Rückgang viel stärker. Deshalb erreichte, den Ergebnissen von HOPF entsprechend¹, der Actinomycetenanteil während der Trockenperiode im Juni 1954 65%. Die darauf wieder einsetzende Vermehrung der Bakterien und Pilze unterdrückte Ende August die Actinomyceten bis auf 0,4%. Während der ungestörten Entwicklung im Sommer 1953 fand keine Unterdrückung statt.

Schluchtwald am Hünstollen

Die Keimzahl des Schluchtwaldes am Hünstollen (Nr. 34, Abb. 2) verläuft infolge seiner nie nachlassenden Bodenfeuchtigkeit völlig gleichmäßig. Es entwickelt sich, für Waldböden charakteristisch (FEHÉR 1933), nur ein breites, temperaturbedingtes Hauptmaximum. Der flachgründige

¹ Die Untersuchungen von HOPF wurden an dem oben unter Nr. 3 aufgeführten Standort gemacht.

Gras-Buchenwald auf Kalk (Pless-Forst, Nr. 33) zeigte vor der Belaubung ein Keimzahlmaximum und während des Laubausbruchs einen starken Rückgang von 366 auf 30 Mill./g. Die verstärkte Transpiration des Bestandes bedingte ein Absinken des Bodenwassergehaltes von 34,3 auf 26,0%. In einer früheren Arbeit wurde auch an Waldpflanzen dieses Standorts ein Frühjahrsanstieg der osmotischen Werte als Zeichen angespannter Wasserversorgung beobachtet (JAGNOW 1951).

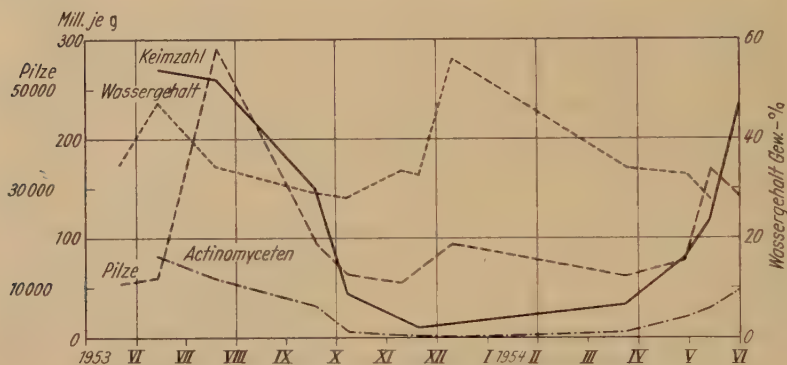


Abb. 2. Schluchtwald am Hünstollen (Acereto-Fraxinetum) 15 cm Bodentiefe

Durch die bodenerwärmende Wirkung der besonnten Laubstreu im Frühjahr vermehren sich die Mikroorganismen im Waldboden eher als in Trockenrasenstandorten. (Zuwachs vom 22. 3.—11. 5. 54 im Schluchtwald 232%, im Trockenrasen 118%).

2. Streuung von Parallelproben

Je vier Parallelproben der Waldstandorte (s. Beschreibung zu Tab. 1) unterschieden sich auch äußerlich. Im Pleß-Forst hatte der schattige *Mercurialis*-Standort Nr. 2 die höchste, die von Waldgräsern besiedelten Standorte Nr. 3 und Nr. 4 fast um die Hälfte niedrigere Keimzahlen.

Der Durchschnittswert der Proben vom Hünstollen entsprach dem feuchten Standort Nr. 2 vom Pleß-Forst. Entscheidende Faktoren scheinen hier weniger das Wasser als Durchwurzelung und Erwärmung zu sein. Der flachere, von *Mercurialis perennis* reich durchwurzelte Standort Nr. 4 genießt mehr Sonnenstrahlung als die steiler exponierten (Nr. 1—3) und hat demzufolge etwa die doppelte Keimzahl. Standort Nr. 2 mit der niedrigsten Keimzahl war am geringsten durchwurzelt.

Die Unterschiede in Menge und Art der Streptomycceten (Anteile verschieden gefärbter Kolonien) sind zum Teil erheblich, lassen sich aber nicht mit Standortseigenschaften in Zusammenhang bringen.

Starke lokale Schwankungen von Keimzahl und Actinomycetengehalt zeigte der Trockenrasen bei Nikolausberg, obwohl er äußerlich sehr ein-

heitlich erscheint. Ähnliche Unterschiede fand auch PETERS (s. RIPPEL-BALDES u. PETERS 1949) bei der kleinräumigen Verbreitung von *Aspergillus niger*.

Auf Grund dieser Erfahrungen wurde bei allen Standorten die zweite Probe im folgenden Jahre an genau der gleichen Stelle entnommen. Es

Tabelle 1. *Parallelproben von gleichen Standorten*

I = Pless-Forst, II = Hünstollen, beide Juli 1953, Glycerin-Glykokoll-Agar 1 : 10⁶, III = Trockenrasen Nikolausberg, Juli 1954, Bouillon-Agar 1 : 10⁷

Parallelprobe		1	2	3	4
Keimzahl (Mill./g)	I	35,2 ± 7,0	40,2 ± 7,5	25,0 ± 4,4	21,5 ± 2,7
	II	40,8 ± 1,3	33,2 ± 8,0	54,7 ± 6,1	75,0 ± 7,0
	III	638 ± 54	296 ± 46	602 ± 91	306 ± 23
Prozent Pilze	I	3,4	3,7	—	2,3
	II	2,0	3,0	2,0	1,0
	III	—	—	0,6	—
Prozent Actino- myceten	I	51	38	37	44
	II	15	30	39	42
	III	23	44	31	14
Prozent gefärbter Streptomyceten:					
farblos	I	55	51	38	56
	II	28	41	17	34
gelb	I	28	27	26	22
	II	32	22	30	47
hellbraun	I	8	9	19	4
	II	32	12	30	6
dunkelbraun	I	4	3	2	4
	II	2	1	5	2
rot	I	4	9	13	14
	II	4	23	13	9
oliv	I	1	—	—	—
	II	—	1	4	0,5
blau	I	—	—	—	—
	II	2	—	1	1,5

Pless-Forst: 1. Dauerprobestelle am Weg, leichte Mulde mit wenig Vegetation. 2. schattiger *Mercurialis*-Standort. 3. lichter, unter *Dactylis Aschersoniana* und *Elymus europaeus*. 4. am Rand einer Lichtung, stärker vergrast. — Hünstollen: 1. Dauerprobestelle, steil, sehr schattig. 2. auf gleicher Höhe, weniger schattig. 3. hangabwärts unter *Lunaria*, sehr feucht. 4. weiter hangabwärts, flacher und trockener als 3, unter *Mercurialis*. — Nikolausberg: Dauerprobestelle in Hangmitte, kurzer Rasen. 2. gleich aussehend, 20 m entfernt auf gleicher Höhe. 3. hangabwärts, in Facies von *Ononis repens*. 4. 40 m nördl. 1 auf gleicher Hanghöhe, in leichter, flachgründiger Rinne.

ist anzunehmen, daß diese zur Zeit des Maximums hervortretenden Unterschiede bei geringer Keimzahl im Herbst und Winter wie auch bei dem durch Lagerung der Proben bedingten Rückgang zurücktreten.

3. Veränderung von Keimzahl und Actinomycetengehalt bei lufttrockener Lagerung

Da die Bodenproben bis zur Verarbeitung oft längere Zeit lagern mußten, wurde an der Trockenrasenprobe (Nr. 1) vom 17. 7. 53 die hierbei eintretende Änderung des Keimgehaltes untersucht (s. Abb. 3)

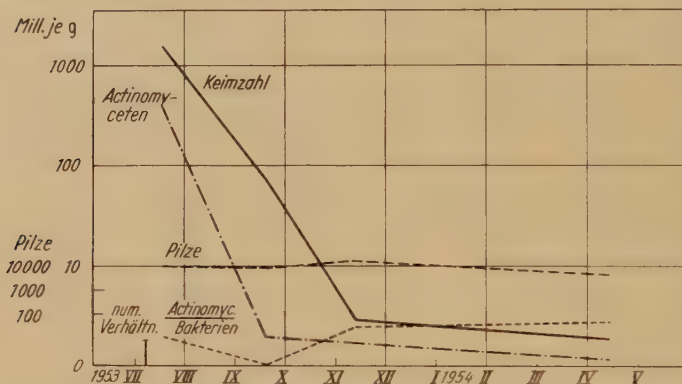


Abb. 3. Veränderung des Keimgehaltes einer Erdprobe (Halbtrockenrasen) bei lufttrockener Lagerung, logarithmisch dargestellt

Der Hauptabfall der Keimzahl erfolgt in den ersten 5 Monaten und erreichte nach 10 Monaten 1/800 des Ausgangswertes.

Der Anteil der Streptomyceten sank in 2 Monaten von 25% auf 3% und erreichte nach weiteren 2 Monaten wieder den Ausgangswert. Die schnellere Abnahme in der ersten Zeit ist auf Absterben der bei günstigen Bedingungen überwiegenden Mycelstücke zurückzuführen, die beim Guß zerbrechen und hohe Keimzahlen hervorrufen (SKINNER 1951). Der sich anschließende langsame Abfall gleicht das Verhältnis wieder aus und beruht auf Sporenresistenz.

Die nur wenig abnehmenden Pilzzahlen sind auf resistente Sporen zurückzuführen und verursachen bei längerer Lagerung eine Erhöhung des Pilzanteils. Die geringe Menge Phycomyceten hielt sich wegen geringerer Trockenheitsresistenz ihrer Sporen (ZOBEL 1943) nicht.

IV. Die Mikroflora der Standorte

1. Keimzahl und Actinomycetengehalt

Tabelle 2 und 3 enthalten als gekürzter Auszug die Ergebnisse von Proben jeweils eines Jahres.

Unter „d“ ist die Lagerdauer in Tagen und unter „D“ die Verdünnungsdezimale der Bodenaufschwemmung angegeben. Die Keimzahlen (mit mittlerem Fehler

„m.F.“) und Actinomycetenanteile sowie die Menge der Pilze und von *Bacillus mycoides* beziehen sich, da weniger selektiv, auf Bouillon-Agar. Geringe Mengen von durchschnittlich weniger als 1 Kolonie je Platte wurden mit „+“ vermerkt. Die meisten Proben stammen aus dem August 1953 oder 1954 und lassen sich deshalb im Actinomycetengehalt, zumal dieser durch Lagerung weniger beeinflusst wird, gut vergleichen.

Tabelle 2. Keimgehalt der Rasenstandorte

Nr.	Standort	pH	Hu- mus i. %	Datum	d	D	Keimz. Mill/g	m. F.	Act. i. %	Pilze in Mill/g	Bac. myc. Mill/g	isol. Act.
1	Mesobrometum . . .	6,8	8,0	22.9.53	3	7	90	12	25	5	—	11
2	Mesobrometum . . .	6,8	9,8	12.7.53	5	7	220	15	24	20	—	7
3	Mesobrometum . . .	6,6	4,8	25.7.53	1	7	180	3	29	20	—	12
4	Mesobr. auf Löß . . .	6,7	7,4	16.8.54	32	6	30	3,2	41	5	—	8
4a	Mesobr. auf Jura . . .	6,8	15,4	16.8.54	32	6	25	4,9	20	10	—	13
5	Lößhohlweg . . .	6,8	5,0	14.8.53	217	6	99	12,2	42	30	—	7
6	Löß-Mesobrom. . .	7,0	6,3	8.8.53	56	7	100	19	37	+	—	6
7	Badberg-Nords. . .	6,8	10,7	8.8.53	56	7	500	84	60	20	—	8
8	Xerobrometum . . .	7,0	5,1	8.8.53	56	7	150	10	49	+	—	7
9	Jurafelsen . . .	7,0	83	9.8.54	19	7	820	132	16	10	—	11
10	Fels-Mesobrom. . .	6,8	11,6	7.8.54	21	6	62	4,2	32	70	—	10
11	Mesobrometum . . .	7,0	11,5	1.8.54	27							
	auf Rohboden: A . . .					7	300	53	27	10	—	9
	A/C-Horizont. . .					6	17	2,7	1	—	+	
12	„Steppenheide“ . . .	6,6	20,7	1.8.54	55	6	58	5,5	41	40	—	8
13	Gipshalde 5—10 cm . . .	6,8	5,7	15.9.53	14	6	113	15	7	+	—	8
	25—30 cm . . .	6,8	1,4				3,6	0,3	33	—	—	
14	Bilstein-Fels . . .	6,6	25,5	4.6.54	6	7	4800	760	46	40	10	17
	Bilstein-Rasen . . .	6,8	7,2				1840	190	46	80	—	
	Wurzeln v. <i>Aspl. septentrionale</i> . . .						3380	210	3	200	—	
15	<i>Sesleria calcarea</i> -Assoziation	6,6	2,2	30.7.54	28	6	17	1,9	22	+	—	19
16	Steppenrasen	6,2	13,8	18.8.53	154	6	20	3,6	55	2	2	14
17	Kalkschutt	7,2	7,0	7.8.54	48	6	33	4,8	42	+	—	10
18	Feldrain (Wiese) . . .	5,4	14,0	4.6.54	11	7	1210	133	12	40	—	7
19	Trockenrasen:											
	Denkmal	5,4	19,1	4.6.54	11	7	1380	165	14	130	10	13
	Waldblöße	5,2	18,0				560	75	27	50	+	
20	Sedo-Scleranthion . . .	5,5	38	4.6.54	11	7	1130	86	22	40	10	21
21	Sedo-Scleranthion . . .	5,1	26	2.6.54	14	7	260	27	19	10	—	14
22	Heide, unter <i>Calluna</i> . . .	4,8	68	2.6.54	14	6	59	5,2	3	38	+	1
	u. <i>Sarothamnus</i> . . .	4,8	21				57	5,3	21	22	—	
	nackter Boden . . .	4,8	26				45	3,0	12	23	+	
23	Corynephorum . . .	5,0	0,9	16.8.53	224	5	0,4	0,04	25	+	+	
24	Caricetum grac. . .											
	Löß-Glei 10 cm . . .	7,0	7,6	5.8.54	23	6	103	14	1	+	—	
	25 cm . . .	7,0	5,0			5	16,2	4	2,5	+	—	
	50 cm . . .					5	5,2	1,2	3,8	+	—	

Trockenrasenstandorte

Die Keimzahl steigt bei annähernd gleicher Reaktion mit der Menge der organischen Substanz. Das zeigt ein Vergleich entsprechender Standorte bei gleicher Lagerdauer (Nr. 1 u. 2, 6 u. 7, 9 u. 10, 14, 20 u. 21).

Der Actinomycetengehalt der Kalkstandorte ist, wie auch frühere Untersucher fanden (WAKSMAN u. CURTIS 1918, JENSEN 1930, REHM 1953), am höchsten. Er bewegt sich zwischen 20 und 60% und liegt meist

zwischen 30 und 40%. Entsprechende Durchschnittswerte von 35% gibt MISUSTIN (1953) für russische Schwarzerdeböden an. Eine Ausnahme bildet der Gips-Rohboden am Sachsenstein (13) mit nur 7% Actinomyceten, vielleicht wegen des geringen Gehaltes an organischer Substanz. Die relative Zunahme mit der Tiefe entspricht den allgemeinen Erfahrungen (WAKSMAN 1916, WAKSMAN u. CURTIS 1916). Allgemein steigt

Tabelle 3. Keimgehalt von Waldböden und alpinen Standorten

Nr.	Standort	pH	Hu- mus i. %	Datum	d	D	Keimz. Mill/g	m. F.	Act. i. %	Pilze in Mill/g	Bac. myc. Mill/g	isol. Act.
25	Hartholzauwald . .	4,8	5,4	8.8.53	238	5	2,2	0,4	3,5	+	+	
26	Weiden-Auwald											
	10—15 cm tief . . .		4,0	15.8.53	182	5	2,7	0,1	41	+	+	
	5 cm tief . . .	6,6		6.8.54	22	6	28	4,2	4	+	—	
	30 cm tief . . .	7,0		6.8.54			27	9,7	—	—	+	
27	trockener Eich.-Hb.- Niederwald . . .	5,2	11	9.6.54	6	7	320		49	20	—	16
28	Querc.-Lithosp.											
	A -Hor. 5 cm . . .	6,6	13,6	31.7.54	28	6	42	4,0	8	+	—	
	(B)-Hor. 20 cm . . .	6,0	4,8				17	1,9	15	+	—	
29	Pineto-Cytisetum . .	7,0	15,8	10.8.53	50	7	80	7,0	19	5	—	16
30	Kiefernforst . . .	6,8	6,9	26.6.53	1	6			47		—	16
31	Flaumeich.Busch . .	6,8	6,0	8.8.53	210	5	5,2	0,4	31	+	+	
32	Querc.-Lithosp. . .	6,8	6,7	7.8.53	220	5	4,0	0,4	20	+	+	13
33	Kalk-Fagetum											
	5 cm tief . . .			12.5.54	7	7	190	33	41	10	+	11
	15 cm tief . . .	6,8	14,8	12.5.54	7	7	50	18	62	—	+	
34	Schluchtwald . . .	6,6	21,8	17.7.53	3	7	260	8	23	+	—	23
35	Kalk-Fagetum . . .	5,8	17,2	12.8.53	170	5	2,6	0,1	25	+	0,5	
36	Luzula-Fagetum											
	A -Hor. 5 cm . . .	5,6		6.8.54	23	6	54	3	0,7	—	6	
	(B)-Hor. 15 cm . . .	6,2	4,1	6.8.54	23	6	21	2,8	—	—	6	
37	Strauch-Fagetum . .	5,2	7,0	6.8.54	18	6	10	1,0	35	2,6	—	
38	Abieto-Fagetum											
	A -Hor. 10 cm . . .	5,0	60	3.8.54	26	6	55	2,9	7	2	—	10
	(B)-Hor. 35 cm . . .	5,1	10,2	3.8.54	26	6	72	8,1	4,5	—	—	
39	Sandstein-Fagetum											
	A -Hor. 0—5 cm . . .	5,3	12,2	18.5.54	10	5	3,4	0,5	8	0,4	—	
	(B)-Hor. 15—20 cm	5,3	4,2	18.5.54	10	5	1,7	0,3	9	+	—	
40	alpine Silikat-Fels- spaltges.	6,0	72	12.8.54	16	7	440	50	10	22	+	7
41	Gletschermehl . . .	6,3	0,8	15.8.53	217	4	0,44	0,05	2	—	—	6
42	alpiner Rasen											
	A -Hor. 0—6 cm . . .	5,0	9,3	13.8.54	14	6	258	19	0,4	3,4	+	
	(B)-Hor. 6—15 cm . .	5,0		13.8.54	14	6	30	14,5	—	+	—	
43	alpiner Rohhumus . .	4,8	43	13.8.54	14	6	33	3,2	0,6	+	—	

auch der Actinomycetenanteil mit der Menge des Bestandesabfalls, worauf bereits WAKSMAN u. CURTIS (1918) und in neuerer Zeit KRASILNIKOV (1953) hinwiesen.

Durchschnittlich etwas weniger Actinomyceten enthalten die schwach sauren silikatischen Rasen- und Felspaltstandorte. Am Bilstein (Nr. 14) fanden sich normalerweise bei sehr hoher Keimzahl 46% Actinomyceten, in der Wurzelerde von *Asplenium septentrionale* jedoch nur 3% bei gleichzeitig stark erhöhtem Pilzanteil.

Übrige offene Standorte

Sie enthalten, sofern hinreichend Pflanzenabfall vorhanden, 10—20 % Actinomyceten. Einen besonders hohen Anteil von 41 % hatte die alpine Felsspalte (Nr. 40) im Sommer 1953. Der Sandboden (Nr. 23) enthielt trotz seines geringen Humusgehaltes noch 25 %.

Vom Nagelkopf (Nr. 22) unterschieden sich Proben unter *Calluna* und *Sarothamnus* trotz gleicher Reaktion: Unbewachsener Boden enthielt 12 % Actinomyceten, Rohhumus (68 %) unter *Calluna* 3 %, dagegen Wurzel Erde unter *Sarothamnus* 21 %, was auf einen fördernden Einfluß der Leguminose schließen läßt. Auch WAKSMAN u. CURTIS (1918) fanden im Humushorizont saurer Podsolprofile nur 3 % Actinomyceten und MISUSTIN (1953) gibt für nordrussische Podsolböden einen durchschnittlichen Actinomycetengehalt von 10 % an. Die Tundraböden enthalten nach dem gleichen Autor nur 1,5 % Actinomyceten. Ähnlich niedrige Anteile fanden sich in den vergleichbaren alpinen Standorten (Nr. 41, 42, 43). Kälte und Rohhumusbildung drängen die Actinomyceten stark zurück, bringen sie jedoch nicht völlig zum Verschwinden.

Ähnlich wirkt auch Sauerstoffmangel. Das vergleyte Lößprofil unter dem Schlankseggenrasen vom Kaiserstuhl (Nr. 24) enthielt mit zunehmender Tiefe bis 50 cm 1—4 % Actinomyceten, während deren absolute Zahl von 1 auf 0,2 Mill. abnahm. Da Lößboden sonst ein guter Actinomycetenstandort ist und die Bodenreaktion in diesem Falle neutral war, kann nur die durch Staunässe bedingte geringe Durchlüftung den niedrigen Actinomycetengehalt verursachen.

Waldstandorte

Die Trockenwälder (Nr. 28—32) haben mittlere Actinomycetenanteile von 20—30 % gemeinsam. Auch bei den übrigen Waldböden liegen sie bei einem p_H -Wert von 5,2 und darüber sowie hinreichender Menge unersetzer Substanz (über 7 % organische Bestandteile) zwischen 20 und 30 % und können in Kalkbuchenwäldern (Nr. 33) bis 60 % erreichen.

Der humusarme, fast neutrale Auwald-Schwemmboden bei Breisach (Nr. 26) enthielt in mittlerer Tiefe relativ viel Actinomyceten, ein entsprechender Standort bei Karlsruhe trotz etwas höherem Gehalt an organischer Substanz dagegen nicht. Möglicherweise spielen Art und Zersetzungsgrad der angeschwemmten Stoffe, Konkurrenz mit Bakterien und vielleicht auch antagonistische Wirkungen zwischen Actinomyceten und Bakterien bei der wechselseitigen Verschiebung des Mengenanteils dieser Organismengruppen eine Rolle. So fanden z. B. CONN u. BRIGHT, daß *Pseudomonas fluorescens*, eine in überschwemmten, nährstoffreichen Rohböden häufiger auftretende Form, Bodenstreptomyceten in der Entwicklung hemmte, wenn sie mit diesen zusammen in sterilen Boden

eingeimpft wurde (zit. nach WAKSMAN 1952). Daß sich die Mikroflora auch im Breisacher Auwald anders entwickeln kann, zeigt der geringe Actinomycetenanteil von 4% im Jahre 1954. PFENNIG (1952) fand jedoch auch 1950 einen sehr hohen Actinomycetenanteil an diesem Standort, was demnach für ihn charakteristisch zu sein scheint.

Verhältnismäßig wenig Actinomyceten fanden sich in sauren, humusreichen Waldböden, so im Buchen-Tannenwald der Schwarzwaldhochlagen (Nr. 38), im Buntsandstein-Buchenwald (Nr. 39) und im bodensauren Auwald (Nr. 25).

2. Das Vorkommen von *Bacillus mycoides*

Nach GRUNDMANN (1934) ist *Bacillus mycoides* eine Leitform kulturell beeinflusster „Dungböden“. Auftreten in größerer Menge (über 1%) zeigt meist Kulturinfluß an, während er in Naturböden entweder nicht oder nur in geringer Menge (unter 1%) auftritt. Er kann somit als Kriterium für den Naturzustand der untersuchten Böden gewertet werden. Von 58 untersuchten fand er sich zu über 1% nur in 7 Proben, von den 39 Rasenstandorten sogar nur in einer. Geringe Mengen von *Bacillus mycoides* enthielt dagegen fast die Hälfte der Standorte.

3. Unterschiede der Mikroflora in verschiedenen Jahren

Proben vom August 1953, die viel Actinomyceten enthielten, zeigten in vielen Fällen im August des folgenden Jahres einen stark verminderten Anteil (Standort Nr. 5, 9, 16, 26, 29, 36 u. 40). Daß solche starken Verschiebungen des Verhältnisses Actinomyceten: Bakterien eintreten können, fand auch HOPF (1947). Sie suchte das durch veränderte Wettbewerbsverhältnisse zugunsten der Bakterien zu erklären. Daß es sich nicht um allgemeine klimatische Einflüsse handeln kann, sieht man daran, daß sowohl am Traifelbergfelsen (Nr. 12) als auch im Niederwald bei Heimbach (Nr. 27) umgekehrt eine starke Erhöhung des Actinomycetengehaltes im Vergleich zum Vorjahre stattfand.

Mit diesen Erscheinungen sind auch oft Änderungen in der Zusammensetzung der Streptomyceten-Population verbunden. Das ließ sich an dem Anteil der Kolonien feststellen, die auf Bouillon-Agar lösliches braunes Pigment abschieden. Ein gesetzmäßiger Zusammenhang zwischen der Menge ihres Auftretens und dem Actinomycetenanteil ließ sich jedoch nicht beobachten. Soweit Erfahrungen mit Glycerin-Glykokollagar-Gußplatten vom gleichen Standort in verschiedenen Jahren vorliegen, läßt sich sagen, daß die gleichen Kolonietypen wiederkehren. Auch weniger häufige Stämme verschwinden niemals völlig.

Bei der vergleichenden Betrachtung der Standorte wurde immer der höhere Anteil in einem der beiden Jahre als charakteristisch angesehen, da er angibt, wieviel Actinomyceten der betreffende Standort beherbergen kann.

V. Die Verbreitung der Antagonisten

1. Test der isolierten Stämme

Tabelle 4 gibt einen Überblick über den Anteil antagonistischer Stämme. Im Durchschnitt wird *Bac. subtilis* am häufigsten gehemmt, dann folgen *Aspergillus terreus*, *Mycobacterium lacticola* und *Escherichia coli*. Die Kalktrockenrasen enthalten am meisten Antagonisten. Ebenso hohe Anteile haben die untersuchten Trockenwaldstandorte, davon noch mehr gegen *Escherichia coli* wirksame Stämme als die Trockenrasen. Nach KRASILNIKOV (1953) enthielt die Schwarzerde bei Kiew so viele Antagonisten wie die untersuchten Trockenrasen. Am meisten fanden sich in humusreichen Waldböden von der Schwarzmeerküste (40 bis 70%), davon bis über die Hälfte an gegen *Esch. coli* wirksamen Stämmen.

Die silikatischen Trockenrasen- und Felsspaltstandorte zeigten einen deutlich niedrigeren Anteil. Den niedrigsten Gehalt hatten die sauren Waldböden, die mit 29% (bezogen auf *Bac. subtilis*) noch deutlich unter den übrigen feuchten Waldböden lagen.

Die von Natur aus pilzreichen sauren Waldböden sind ungünstigere Streptomycetenstandorte (unteroptimale pH-Werte) und enthalten, ver-

Tabelle 4. Prozentualer Anteil der Antagonisten aus verschiedenen natürlichen Standortgruppen

Böden. In () Anzahl der untersuchten Standorte	Anzahl Stämme	<i>Bac. subtilis</i>			<i>Esch. coli</i>	<i>Myc. lact.</i>	<i>Asp. terreus</i>		
		(s)	m	st)			(s)	m	st)
Kalktrockenrasen (17)	157	71	(35	27	9)	36	48	(7	19 22)
silikatische Trockenrasen- und Felsspaltstandorte (7)	82	48	(28	15	5)	19	42	(8	22 12)
Trockenwaldstandorte (6)	67	70	(37	28	5)	15	38	(8	9 21)
neutral bis schwach saure Waldböden (4)	45	40	(18	11	11)	21	30	(12	— 18)
saure Waldböden (7)	24	29	(8	17	4)	14	25	(21	— 4)
Gesamt (41)	375	57	(29	21	7)	27	41	(9	14 18)

Für *Bac. subtilis* und *Aspergillus terreus* ist angegeben, wieviele der wirksamen Stämme nur eine schwache Hemmwirkung (s, Hemmzone bis 2 mm breit), wieviele mittelstark (m, Hemmzone 2—5 mm breit) und wieviele stark (st, Hemmzone über 5 mm breit) wirkten. In Klammern Anzahl der untersuchten Standorte

glichen mit den Trockenrasen, mit 25 % nur die Hälfte des Anteils an (gegen *Asp. terreus*) pilzantagonistischen Stämmen. Hinzu kommt, daß die im Test nur schwach wirksamen Stämme, die für einen ökologischen Antagonismus nicht in Frage kommen, weit überwiegen (21 %). Umgekehrt sind in den Trockenrasen mittelstark und stark wirksame Pilzantagonisten relativ und absolut in der Mehrzahl. Die dort für Streptomyceten günstigen ökologischen Faktoren wirken weniger selektiv und gestatten einer größeren Mannigfaltigkeit von Stämmen Entwicklung. Darunter werden auch mehr Stämme sein, die durch Bildung von Hemmstoffen der Konkurrenz anderer Organismen Einhalt zu gebieten vermögen.

Abgesehen von der Ausnahme der Pilzantagonisten in sauren Waldböden sind, wie schon STAPP (1953) fand (Test gegen *Bac. fusiformis*), die schwach wirksamen Stämme am häufigsten, während gerade die stark antagonistischen den geringsten Anteil ausmachen.

2. Sprühtest auf Gußplatten

Der Test der isolierten Stämme lieferte wenig umfangreiches Material zur Beurteilung des Antagonistengehaltes der Standorte. Zudem entspricht die Auswahl der Stämme von Gußplatten nicht der tatsächlichen mengenmäßigen Zusammensetzung der Population, was die Rückübertragung der Testergebnisse erschwert. Zur Sicherung der Befunde wurde der Anteil der Kolonien mit Hemmzonen auf Bouillon-Agar-Gußplatten nach Besprühen mit einer 24 Std alten Kultur von *Bac. subtilis* und 24 Std Bebrütung ausgezählt. Tab. 5 bringt diese Ergebnisse zusammen mit denen von KRASILNIKOV (1953), der mit einer ähnlichen Methode arbeitete (Überschichten der Gußplatten mit bakterienhaltigem Nähragar). Die größere Anzahl ausgezählter Kolonien bietet eine höhere statistische Sicherheit.

Die Ergebnisse bestätigen das sich aus den Einzeltesten ergebende Verteilungsbild (s. Tab. 4), wenn man berücksichtigt, daß dort nur schwach wirksam gefundene Stämme (Hemmzone unter 2 mm) als Einzelkolonien keine Hemmzone ausbilden und nicht mitzählen.

Ein Vergleich mit den russischen Ergebnissen zeigt, daß der Gehalt der Trockenrasen an antagonistisch wirksamen Streptomyceten dem der Schwarzerde entspricht. Ähnliche Anteile haben weiterhin die Trockenwaldstandorte und die Waldböden vom Schwarzen Meer, die übrigen untersuchten Waldböden und die podsoligen russischen Böden, die silikatischen Trockenrasen und die russischen Podsolböden. Der niedere Anteil der russischen Torfböden entspricht unseren sauren offenen Standorten auf Silikatuntergrund.

3. Wirksamkeit und Bildung von Hemmstoffen im Boden

Vier stark wirksame Stämme wurden teils auf Glycerin-Glutaminsäurelösung (0,25%), teils auf Pepton-Glucoselösung 23 d kultiviert. Die Kulturlösungen der Stämme wurden vorher im Lochtest gegen *Bac. subtilis* ausgetestet. Danach

wurde eine Bodenfiltration nach dem Vorgang von WALLHÄUSSER (1951) vorgenommen. Die Lösungen wurden mit der Wasserstrahlpumpe durch in Glasröhren von 1 cm Durchmesser eingefüllte, 10 cm hohe Bodensäulen gesaugt. Die verwendeten Bodenarten waren ein unsteriler humoser Sand- und ein unsteriler humoser Tonboden. Den Sandboden durchliefen die Lösungen schnell, während die Passage durch den Tonboden etwa 5 min dauerte. Die filtrierten Lösungen wurden danach wieder gegen *Bac. subtilis* getestet.

Tabelle 5. *Prozentualer Anteil der antagonistischen Streptomyceten in verschiedenen Böden (Sprühtest)*

Standort	Anzahl ausgezählter Stämme	gegen <i>Bac. subtilis</i> wirksam		gegen <i>Esch. coli</i> wirksam	
		absolut	%	absolut	%
Kalktrockenrasen (11) ¹ .	786	299	38		
Silicat-Trockenrasen (6) .	859	103	12		
saure Standorte auf Silicat- boden (Heide, Felsspalt, Sand) (5)	198	10	5		
Trockenwaldstandorte (3)	109	38	35		
übrige Waldböden (4) . .	209	37	18		
KRASILNIKOV 1953:					
Schwarzerde von Kiew. .	350	152	43	88	24
Schwarzerde vom Kaukasus	104	26	25	22	21
humusreiche Schwarzmeer- waldböden	140	42	30	38	27
kastanienfarbige Böden					
Grusiniens	248	28	11	—	—
podsolige Böden	420	78	18	14	3
Podsolböden	290	38	13	6	2
Torfböden	148	8	5	2	1,3

¹ In () Anzahl der Bodenproben.

Das Ergebnis zeigt Tab. 6. Bei allen Stämmen außer 6 (Nr. 34) verminderte sich die Wirksamkeit oder verschwand, bei Sandboden weniger als bei dem stark oberflächenaktiven Tonboden. Während der auch äußerlich durch Verschwinden oder Verblassen der Farbe sichtbaren Adsorption von Lösungsbestandteilen sind auch die Hemmstoffe zurückgehalten worden. Basische Hemmstoffe werden von den schwach sauren Bodenteilchen adsorbiert, saure nicht, könnten also, falls im Boden gebildet, in gewisser Entfernung wirken (STEVENSON u. LOCHHEAD 1953 am Beispiel des sauren Pilzhemmstoffes Claviformin). Letzteres scheint bei Stamm 6 (Nr. 34) der Fall zu sein. Produziert ein Stamm saure und basische Hemmstoffe nebeneinander, wird, wie bei Stamm 12 (Nr. 30), bei Boden-

durchgang nur eine Wirksamkeitsminderung stattfinden. Selbst unter der Annahme, daß die bei der Kultivierung auf nährstoffreichen Medien auftretenden Hemmstoffe auch beim Wachstum im Boden gebildet werden, wird sich doch deren Wirksamkeit auf Grund dieser Erscheinungen nur auf einen sehr engen Umkreis um den Mikrostandort erstrecken (RIPPEL-BALDES 1955).

Tabelle 6. *Hemmzonen von Kulturlösungen gegen Bac. subtilis vor und nach der Bodenfiltration in Millimeter*

Stamm (Serie)	Farbe der Lösung vor (v) und nach (n) Filtration	Hemmwerte		
		vor Filtration	durch Sand filtriert	durch Ton filtriert
12 (Nr. 30) (<i>Scabies</i>) auf Glyc.-Gluta- minsäure	v: dunkelbraun n: hellbraun	8,0	3,0	3,0
10 (Nr. 30) (<i>Antibio- ticus</i>) auf Glyc.- Glutaminsäure	v: dunkelbraun n: hellbraun	4,0	3,5	—
23 (Nr. 34) (<i>Coeli- color</i>) auf Glyc.- Glutaminsäure	v: rötl.-violett n: farblos	3,0	2,0	0,5
6 (Nr. 34) VIc (<i>Dia- staticus</i>) auf Pep- ton-Glucose	v: blaßgelb n: blaßgelb	5,0	n.b.	5,0

Die Menge der im Boden gebildeten Antibiotica ist jedoch meist so gering, daß sie sich dem Nachweis durch Laborteste entzieht. Das zeigte folgender Versuch: Zur Prüfung auf Keratinabbau wurden alle Stämme in Petrischalen auf sterilisierter Komposterde mit Wasser und einem Zusatz von Haaren 52 d bebrütet. Einige Stämme wuchsen und versporteten dabei relativ gut. Von diesen wurden 16 im Test stark wirksame herausgesucht und deren Kulturflüssigkeit im Lochtest gegen *Bac. subtilis* ausgetestet. Es wurde bei keinem Stamm eine Hemmzone beobachtet.

STEVENSON (1954) zeigte indessen, daß im Boden durch Test nicht nachweisbare geringe Hemmstoffmengen antagonistischer Streptomyceten bei *Helminthosporium* Wachstumsabnormitäten hervorriefen, wie sie sonst nur bei Zugabe des in Kulturlösung gebildeten Antibioticums auftreten. In manchen Fällen mag ein beobachteter Antagonismus im Boden auf Konkurrenz um die Nährstoffquellen und nicht auf ausgeschiedenen Hemmstoffen beruhen, obwohl man dies nach dem Labortest zunächst vermuten könnte (THORNTON u. SKINNER 1953, Sammelreferat).

VI. Einteilung der isolierten Stämme

1. Ermittlung der kulturellen Merkmale

Obwohl systematische Studien, wie sie neuerdings von KUTZNER (1956) vorgelegt wurden, nicht das Ziel dieser Arbeit waren, mußte eine Einteilung der 367 isolierten Stämme vorgenommen werden. Die schon lange

bekannte große Variabilität morphologischer wie auch physiologischer Merkmale (LIESKE 1922, TEMPEL 1931 u. a.) macht die Abgrenzung eng umschriebener Arten sehr problematisch. COWAN (1955) behandelte diese grundsätzliche Schwierigkeit und betrachtete die in die Systematik der Schimmelpilze (THOM) und auch neuerdings der Streptomyceten (BALDACCI u. Mitarb. 1953, 1954) eingeführte Aufstellung von „Reihen“ als eine Lösung, die den Verhältnissen am besten gerecht wird. Die hier verwendete Einteilung von BALDACCI gründet sich auf Farbe von Substratmycel und Luftmycel und enthält 21 Reihen, von denen jede größere nach kulturellen Merkmalen (willkürlich) in Untergruppen aufgeteilt wurde.

Folgende Merkmale wurden ermittelt und karteimäßig erfaßt: Farbe und Wachstum auf 1. Glycerin-Glykokollagar (Glyc.-Glyk.) 2. Haferflockenagar (Haf.) 3. Kartoffelscheibe. Weiterhin 4. Gelatine-Stichkultur (0,5% Pepton, 15% Gelatine), 5. Stärkeabbau (1% lösl. Stärke, 0,5% KNO_3), 6. Caseinabbau (Milchagarplatten aus 1 T. Magermilch u. 2 T. Wasser), 7. Bildung brauner Pigmente auf Glyc.-Glutaminsäure (0,25%)- und Pepton-Glucoselösung.

FLAIG u. Mitarb. (1952) gaben eine Gruppeneinteilung auf Grund der Fähigkeit oder Unfähigkeit, braune Pigmente mit Pepton, Glykokoll und Glutaminsäure oder auch einer oder zweier dieser N-Quellen zu bilden. Sie fanden keinen systematischen Zusammenhang zwischen den sonstigen physiologischen Eigenschaften der Stämme, konnten aber elektronenoptisch für einzelne Gruppen charakteristische Sporenformen nachweisen. Diese Pigmentbildung wurde bei der Einteilung der Untergruppen mit verwendet.

An Hand von Abklatschpräparaten wurden die Sporophoren auf ihre Windungsrichtung untersucht. Übereinstimmend mit STAPP (1953) waren die meisten (83%) gerade oder gewellt, 12% schraubig links, 4% schraubig rechts und 1% sowohl links wie rechts gewunden (Windungssinn infolge der optischen Vertauschung von rechts und links umgekehrt).

2. Beschreibung der Gruppen

I: Serie *ALBUS* (54 Stämme). Substratmycel (Sm) farblos bis blaß hellbraun oder bräunlichgelb, Luftmycel (Lm) weiß bis weißgrau.

a) Sm. auf Glyc.-Glyk. farblos bis hellbraun, Stärke- und Caseinabbau gut bis sehr gut.

b) wie a), Stärke- oder Caseinabbau fehlend.

c) Sm. auf Glyc.-Glyk. oder Haf. bräunlichgelb, Stärke- und Caseinabbau gut bis sehr gut.

d) wie c), Stärke- oder Caseinabbau fehlend.

II: Serie *ALBOFLAVUS* (21 Stämme). Sm. hellbraun bis bräunlichgelb, Lm. gelblichgrau.

a) Sm. auf Glyc.-Glyk. hellbraun, auf Haf. oft olivbraun. Lm. auf Stärkeagar meist rötlichgrau, Stärke- u. Caseinabbau gut bis sehr gut.

b) 1 Stamm wie a), mit fehlendem Stärke- und Caseinabbau.

c) Sm. auf Glyc.-Glyk. bräunlichgelb, Lm. blaßgelb (wenige Stämme)

III: Serie *GRISEUS* (20 Stämme). Sm. hellbraun, Lm. grünlichgrau., Stärke- und Caseinabbau mittel bis gut.

a) Sm. auf Glyc.-Glyk. dunkel- bis schwarzbraun, starke Bildung braunen Pigments auf Pepton- und Glutaminsäurelösung.

b) Sm. auf Glyc.-Glyk. hellbraun, lösl. Pigment schwach oder fehlt.

IV: Serie *VIRIDIS* (3 Stämme). Sm. blaßhellbraun, Lm. blaugrün.

V: Serie *ROSEUS* (7 Stämme). Sm. farblos bis hellbraun, Lm. auf Haf. rosa, sonst weiß.

VI: Serie *DIASTATICUS* (47 Stämme). Sm. hellbraun, Lm. grau, Stärke- und Caseinabbau gut.

a) Lm. aschgrau, auf Pepton starkes braunes Pigment, sonst meist kein Pigment.

b) wie a), auf Pepton keine Pigmentbildung.

c) Lm. bräunlichgrau, auf Glyc.-Glyk. aschgrau. Wenig oder kein lösliches Pigment.

VII: Sm. farblos, Lm. aschgrau mit weißen Tupfen (Sporenhyphenbüschel) Pigment fehlt (5 Stämme).

VIII: Serie *AUREUS* (105 Stämme). Sm. braun bis gelb, Lm. rötlichgrau oder gelb, lösliches braunes Pigment.

a) Sm. dottergelb, Lm. auf Glyc.-Glyk. gelb, nie rötlichgrau. Kein oder wenig braunes Pigment, Caseinabbau gut, Stärkeabbau fehlt.

b) Sm. auf Glyc.-Glyk. hell- bis dottergelb, Lm. rötlichgrau, Stärke- und Caseinabbau meist gut.

c) Sm. auf Glyc.-Glyk. oder Haf. gelb, sonst hellbraun, Lm. rötlichgrau, Stärke- und Caseinabbau gut bis sehr gut.

d) wie c), Stärkeabbau fehlend.

e) wie c), Caseinabbau fehlend.

f) Sm. hellbraun, Lm. rötlichgrau, Stärke- u. Caseinabbau gut.

g) wie f), Stärkeabbau fehlend.

h) wie f), Caseinabbau fehlend.

i) Sm. dunkelbraun, Lm. rötlichgrau, starkes lösliches Pigment.

IX: Serie *MADURAE* (6 Stämme). Sm. auf Glyc.-Glyk. zitronen- bis dottergelb, auf Stärkeagar hellorange, Lm. weiß bis rosa.

Serie X: (10 Stämme). Sm. auf Glyc.-Glyk. kastanienbraun, Lm. weiß bis weißgrau, Stärke und Casein meist abbauend.

Serie XI: (18 Stämme). Sm. wie bei X, Lm. grau, braunes Pigment mit Pepton und (oder) Glykokoll.

a) Lm. aschgrau.

b) Lm. bräunlichgrau.

XII: Serie *Antibioticus* (21 Stämme). Sm. dunkel bis schwarzbraun (auf Haf. meist hellbraun), Lm. grau.

a) Lm. aschgrau, starkes braunes Pigment, Caseinabbau fehlt.

b) Lm. bräunlichgrau, starkes braunes Pigment, Caseinabbau fehlt.

c) Lm. bräunlichgrau, Pigment fehlt, Caseinabbau und Gelatineverflüssigung meist stark.

XIII: Serie *SCABIES* (17 Stämme). Sm. dunkelbraun, Lm. weiß.

a) mit starkem braunem Pigment. b) ohne braunes Pigment (1 Stamm).

XIV: Serie *SULPHUREUS* (1 Stamm). Sm. dunkelbraun, Lm. gelb.

XV: Serie *RUBRIRETICULI* (13 Stämme). Sm. mennige- bis feuerrot, Lm. rosa bis rot, Stärke und Casein meist abbauend.

a) ohne lösliches braunes Pigment. b) mit lösl. braunem Pigment.

XVI: Serie *VIOLACEUS* (19 Stämme). Sm. rötlichviolett oder blau, Lm. verschieden. Untergruppe a—c mit rötlichvioletter Sm. sind Rhodomycinbildner der Art *Streptomyces purpurascens* LINDENBEIN (1952) (s. a. FROMMER, 1955). Untergruppe d entspricht *Str. coelicolor* (bildet Actinorhodin, Farbumschlag von Blau nach Rot beim Ansäuern).

a) Lm. weiß bis aschgrau, nur rotes lösliches Pigment.

b) Lm. rötlichgrau, auf Pepton starkes braunes, daneben mit Glyk. und Glutaminsäure rotes lösliches Pigment.

c) Lm. rötlichgrau, nur braunes lösliches Pigment.

d) Sm. blau, Lm. hellblau bis aschgrau.

Die roten und blauen Stämme, die Stämme der Gruppe X und Angehörige der Serie „*Albus*“ (I) sind am häufigsten antibiotisch wirksam. Am wenigsten aktive Stämme enthalten die Serien „*Roseus*“ (V), „*Gri-seus*“ (III) und Serie VII. Serie „*Rubrireticuli*“ (XV) enthält vorwiegend antagonistische Trockenrasenstämmen und hemmt besonders stark *Aspergillus terreus* (s. S. 288), der von den Vertretern anderer Serien weniger gehemmt wird.

VII: Die Verteilung der Streptomycetengruppen auf verschiedene Standortstypen

Nach HORVATH u. Mitarb. (1951) sowie KRASILNIKOV (1953) besteht kein Zusammenhang zwischen den Pflanzengesellschaften und der Streptomycetenflora (Antagonistengehalt) ihrer Böden. Doch werden bei diesen Arbeiten keine bestimmten Stammgruppen berücksichtigt. Es ist jedoch zu erwarten, daß manche Streptomycetengruppen bestimmte, ökologisch umgrenzte Standortstypen bevorzugen oder auf diese beschränkt sind.

In Tabelle 7 sind die untersuchten Standorte in Gruppen zusammengefaßt (A-D) und Stetigkeit sowie Mengenanteil der beschriebenen Serien angegeben:

Es bedeuten: A Kalktrockenrasen (17 Standorte, Nr. 1—17). B silikatische Rasen- und Felsspaltgesellschaften (9 Standorte, Nr. 18—22, 40—43). C Trockenwälder (6 Standorte, Nr. 27—32). D feuchte Wälder (11 Standorte, Nr. 25—26, 33—39). — Die Stetigkeit ist in römischen Ziffern angegeben (I in bis zu 20% der Standorte, II in 20—40%, III in 40—60%, IV in 60—80% und V in 80—100% der Standorte vorkommend). — Bei der Mengenschätzung (arabische Ziffern 1—3) wurden unterschieden: 1. seltene Stämme (unter 10%), 2. zurücktretende Stämme (10—40%), 3. dominierende Stämme (über 40% der Streptomycetenpopulation). Einen Anhaltspunkt für diese Schätzung gab die Anzahl der entsprechend gefärbten Kolonien. Sie wurde für jede Glycerin-Glykokollagar-Gußplatte und jeden Farbton notiert. Unter Zuhilfenahme des Aussehens der Stämme beim Isolieren und ihrer Zuordnung ließ sich so die relative Häufigkeit einer Stammgruppe zuverlässig abschätzen. Genauere Angaben haben angesichts der nachgewiesenen Schwankungen in der Zusammensetzung der Mikroflora keinen Sinn.

Die häufigsten und mengenmäßig hervortretendsten Serien sind *Aureus* (in 80%), *Albus* (in 67%) und *Diastaticus* (in 65% der Bodenproben vorkommend). In einer Zusammenstellung von WAKSMAN (1950)

über das Vorkommen verschiedener Streptomycetenarten in 20 größtenteils nordamerikanischen Bodenproben verschiedenster Herkunft sind die oben genannten Serien ebenfalls am häufigsten vertreten. Im einzelnen lassen sich folgende Verteilungstypen unterscheiden:

Tabelle 7. *Stetigkeit und Menge der Streptomycetengruppen in den Standortstypen*
Zeichenerklärung im Text

Gruppe	Zahl der Stämme	A	B	C	D
I <i>Albus</i>	52	V 1—3	IV 1—2	IV 1—3	III 2—3
II <i>Alboflavus</i> . . .	21	II 1—2	III 1—3	IV 1—2	II 1—2
III <i>Griseus</i>	20	III 1—2	III 1—3	—	I 3
IV <i>Viridis</i>	2	I 1	—	I 1	—
V <i>Roseus</i>	7	I 1	II 1—2	—	I 3
VI <i>Diastaticus</i> . . .	43	IV 1—3	IV 2—3	IV 1—3	IV 1—2
VII	4	—	—	II 1—2	I 1
VIII <i>Aureus</i> a—e . .	49	IV 1—3	IV 1—2	III 1—3	II 2
<i>Aureus</i> f—i . .	53	III 2—3	II 2	III 2—3	IV 3
<i>Aureus</i> f	34	II 2—3	II 2	III 2	IV 3
IX <i>Maduræ</i>	5	I 1	I 2	—	—
X	9	II 1—2	II 1	I 1	I 1
XI	18	I 1—2	III 1	III 1—2	III 1—2
XII <i>Antibioticus</i> . .	20	II 1	IV 1	IV 1	—
XIII <i>Scabies</i>	16	III 1	—	III 1	I 1
XIV <i>Sulphureus</i> . . .	1	—	I 1	—	—
XV <i>Rubrireticuli</i> . .	12	III 1	II 1	I 1	I 1
XVI a—c <i>purpurascens</i>	14	II 1—2	I 1—2	I 1—2	—
XVI d <i>coelicolor</i> . . .	5	—	I 1	—	II 1

1. ausschließlich oder bevorzugt in Trockenrasen: *Rubrireticuli*, bes. XVa, IIIa *Griseus*, XVIa-c *purpurascens*, Serie X.

2. mit größter Stetigkeit in Waldstandorten: VIII f *Aureus*, XIa-b, XVI d *coelicolor*, Serie VII.

3. Gruppen mit deutlicher Bevorzugung des trockeneren Bereichs, auch in Trockenwäldern: VIII a-e *Aureus*, XIII *Scabies*, IX *Maduræ*.

4. Gemäßigte Standorte (B + C) bevorzugende Gruppen: II *Alboflavus*, XII *Antibioticus*.

5. Ohne Bevorzugung einer Standortgruppe: I *Albus*, VI *Diastaticus*.

Aufschlußreich ist ferner, daß die Rasen- und Trockenwaldstandorte sowie auch die feuchten Waldböden auf Kalk am artenreichsten sind. Sie enthalten im Durchschnitt Vertreter von 6—7 Untergruppen. Die übrigen Waldstandorte entsprechen nicht mehr den optimalen Lebensbedingungen der Streptomyceten und haben durchschnittlich nur Vertreter von 3 Untergruppen in ihrer Population.

Zusammenfassung

1. Die Keimzahl in Trockenrasenböden erreicht in niederschlagsreichen Sommermonaten nur ein Hauptmaximum unter Fortfall der sonst eintretenden trockenheitsbedingten Depression. In Waldböden steigt sie infolge der Erwärmung der Laubdecke schneller an und kann ein Frühjahrs-Vormaximum erreichen.

2. Parallelproben können in Keimzahl und Actinomycetengehalt um bis über 100% schwanken. Mehrmonatige Lagerung verändert den Actinomycetenanteil nur unwesentlich.

3. Die Kalktrockenrasen- und Trockenwaldstandorte (26 Proben) hatten von allen mit 30—40, im Extrem 60% den höchsten Actinomycetenanteil. Am wenigsten Actinomyceten fanden sich in sauren Böden mit einer Reaktion unter pH 5,0.

4. Kalktrockenrasen und Trockenwaldstandorte enthielten am meisten antagonistische Streptomycetenstämme: 70% hemmten *Bac. subtilis*, jedoch nur 7% stark. Dann folgten Rasen- und Felsspaltstandorte auf Silicatuntergrund (48%) und neutrale bis schwach saure Waldböden (40%). Am wenigsten Antagonisten enthielten saure Waldböden (29%). *Mycobacterium lacticola* wurde von 27% und *Escherichia coli* von 21% aller Stämme gehemmt. *Aspergillus terreus* wurde von 48% der Trockenrasenstämme stark und von 25% der Stämme aus sauren Waldböden nur schwach gehemmt. Der dort verringerte Antagonismus wird als Ausdruck verminderter Konkurrenzfähigkeit unter ungünstigen Lebensbedingungen angesehen.

5. Bei Filtration von Antagonisten -Kulturlösung durch Boden wurde Abnahme der Hemmstoffe festgestellt. Bei Kultur auf steriler Erde konnten keine Hemmstoffe nachgewiesen werden.

6. Vorkommen und Mengenanteile der nach BALDACCI in Serien zusammengefaßten Stämme in den Bodenproben wurden ermittelt. Es besteht eine Bevorzugung bestimmter Standortstypen durch einzelne Gruppen, jedoch kein engerer Zusammenhang zwischen Pflanzengesellschaft und Streptomycetenpopulation.

Herrn Prof. Dr. A. RIPPEL-BALDES danke ich für Anregung und Unterstützung bei der Durchführung vorliegender Arbeit.

Ausgeführt mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Literatur

BALDACCI, E. u. Mitarb.: Intern. Congr. Microbiol. Symp. Actinomycetales 20—39 (1953); — Arch. Mikrobiol. 20, 347—357 (1954). — BENEDICT, R. G., u. Mitarb.: Appl. Microbiol. 3, 1—6 (1955). — BERGEYS Manual of determinative Bacteriology, 6. Aufl. Baltimore 1948. — BRAUN-BLANQUET, J.: Pflanzensoziologie. Jena 1928.

COWAN, S. T.: J. Gen. Microbiol. 12, 314—319 (1955).

FLAIG, W., u. Mitarb.: Plant and Soil **IV**, 118—127 (1952). — FROMMER, W.: Arch. Mikrobiol. **23**, 105—122 (1955).

GRUNDMANN, E.: Arch. Mikrobiol. **5**, 57—83 (1934).

HOPF, M.: Arch. Mikrobiol. **14**, 661—677 (1950). — HORVATH, J., u. Mitarb.: Ann. Inst. Biol. (Tihany) Hungariae Acad. Scient. **20**, 225—244 (1951).

JAGNOW, G.: Staatsexamensarbeit Göttingen (unveröffentlicht, 1951).

KRASILNIKOV, N. A.: Mikrobiologija **22**, 3—10 [Russisch] (1953). — KUBIENA, W.: Bestimmungsbuch und Systematik der Böden Europas. (1953). — KUTZNER, H. J.: Dissertation Hohenheim (1956).

LIESKE, R.: Bakterien und Strahlenpilze (Berlin 1922). — LINDENBEIN, W.: Arch. Mikrobiol. **17**, 361—383 (1952). — LOHMEYER, W.: Mitt. Florist.-Soz. Arb.-Gem. N.F. **5**, 138—144 (Stolzenau) (1955).

MISUSTIN, E.: Priroda (Leningrad) **10**, 24—32 (1953).

OBERDORFER, E.: Pflanzensoziologische Exkursionsflora für Südwestdeutschland (Stuttgart). (1949). — Mitt. Florist.-Soz. Arb.-Gem. N.F. **2**, 27—32 (1950). — Beitr. z. naturkundl. Forsch. in Südwestdeutschland **XII**, H. 1 (1953).

PFENNIG, N.: Dissertation Göttingen 1952. — Arch. Mikrobiol. **18**, 327—345 (1953).

REHM, H. J.: Wiss. Z. Univ. Greifswald **3**, 5—15 (1953). — RIPPEL-BALDES, A., u. J. PETERS: Arch. Mikrobiol. **14**, 203—211 (1949). — RIPPEL-BALDES, A.: Grundriß der Mikrobiologie, 3. Aufl., Göttingen 1955. — v. ROCHOW, M.: Die Pflanzengesellschaften des Kaiserstuhls. Jena 1951.

SCHOLLENBERGER, C. J.: Soil Sci. **24**, 65—68 (1927). — SKINNER, F. A.: J. Gen. Microbiol. **5**, 159—166 (1951). — SKINNER, F. A., u. Mitarb.: J. Gen. Microbiol. **6**, 261—271 (1952). — STEVENSON, L. L.: Nature (Lond.) **174**, 598 (1954). — STAPP, C.: Z. Biol. II **107**, 129—150 (1953).

TEMPEL, E.: Arch. Mikrobiol. **2**, 40—71 (1931). — THORNTON, H. G., u. F. A. SKINNER: VI. Inter. Congr. Microbiol. Sympos. Actinomycetales. 174—190 (1953).

WAKSMAN, S. A., u. R. E. CURTIS: Soil Sci. **1**, 99—134 (1916). — WAKSMAN, S. A.: Soil Sci. **1**, 363 (1916). — WAKSMAN, S. A., u. R. E. CURTIS: Soil Sci. **6**, 309—319 (1918). — WAKSMAN, S. A.: The Actinomycetes. Chronica Bot. Comp. (1950). — Soil Microbiology (New York) (1952). — WALLHÄUSSER, K. H.: Arch. Mikrobiol. **16**, 237—251 (1951). — WEEKS, O. B.: J. Bacter. **47**, 446—447 (1945).

ZOBL, K. H.: Arch. Mikrobiol. **13**, 191—206 (1943).

(Aus dem Institut für Kulturpflanzenforschung Gatersleben der
Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin)

Der Abbau von phenolischen Substanzen durch *Aspergillus niger*

Von

H. FRIEDRICH

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 25. Juni 1956)

Bei seinen Untersuchungen über den Einfluß von Pilzen auf wäßrige Extrakte aus Galläpfeln entdeckte SCHEELE (1787) die Gallussäure. VAN TIEGHEM (1867) konnte feststellen, daß die Zersetzung des Tannins auf die Tätigkeit von Schimmelpilzen zurückzuführen ist, und identifizierte den dabei vorherrschenden Pilz als *Aspergillus niger*. Außerdem waren auch Pilze aus der *Penicillium glaucum*-Gruppe in der Lage, Gallotannin unter Bildung von Gallussäure zu vergären. Später gelang FERNBACH (1900) und POTTEVIN (1900) gleichzeitig, aber unabhängig voneinander, der Nachweis des für die Gallotanninspaltung entscheidenden Ferments, der Tannase, deren Bildung sie in der Kulturflüssigkeit von *Aspergillus niger* in Gegenwart von Gallotannin und Nährstoffen beobachteten. Auch mit zellfreien Tannasepräparaten ließ sich eine Spaltung des Tannins herbeiführen. In breit angelegten Versuchen beobachtete KNUDSON (1913), daß lediglich Pilze aus den Gattungen *Penicillium* und *Aspergillus* Tanninkonzentrationen von mehr als 2% vertrugen und ohne weitere Kohlenstoffquelle auskommen konnten, während Vertreter anderer Gattungen (*Mucor*, *Polyporus*, *Fusarium*) in Gegenwart von anderen Nährstoffen lediglich Tanninkonzentrationen bis zu 0,25% ohne Schädigung vertrugen. In Untersuchungen von KESELING (1929) bzw. RIPPEL u. KESELING (1930) wurde die Tanninkonzentration der Lösungen, in denen *Penicillium* und *Aspergillus* wuchsen, sogar bis auf 25% gesteigert, ohne daß die Pilze geschädigt worden wären¹.

Man war allgemein der Ansicht, daß mit Hilfe von Tannase das Gallotannin in Glucose und Gallussäure gespalten wird, wovon der Pilz die Glucose umsetzt, während sich die Gallussäure in der Kulturflüssigkeit anreichert. Bei der auch heute noch gebräuchlichen technischen Anwendung (vgl. PRESCOTT u. DUNN, 1949) der Tannasespaltung von Gallotannin zur Erzeugung von Gallussäure werden geklärte Gerbstoffextrakte sterilisiert und mit *Aspergillus niger*-Reinkultur beimpft. Die Fermentationsflüssigkeit wird unter genauer Temperaturkontrolle mechanisch gerührt und belüftet. Von Zeit zu Zeit kontrolliert man den Fortgang der Reaktion, weil erfahrungsgemäß bei zu langer Einwirkungszeit die Menge an gebildeter Gallussäure wieder abnimmt. Ähnliche Beobachtungen hatten bereits NICHOLSON u. Mitarb. (1931) gemacht.

¹ Diese Eigenschaft kann zur elektiven Identifizierung des Pilzes im Boden verwendet werden (RIPPEL, 1940; RIPPEL-BALDES u. PETERS, 1949).

Sie fanden, daß stets mehr Gallotannin umgesetzt wurde als Gallussäure entstand, und schlossen daraus, daß in der Tannase noch ein weiteres Ferment vorhanden sein müsse, das Gallussäure abbaut. Für dieses Ferment schlugen sie die Bezeichnung Pyrogallase vor.

Ich wollte versuchen, in Pflanzenextrakten, die neben einer Anzahl von phenolischen Stoffen auch Gallotannin enthielten, das Tannin durch Tannase zu spalten, um den störenden Einfluß des Gerbstoffs bei der papierchromatographischen Untersuchung auszuschalten. Um dafür

günstige Bedingungen zu ermitteln, verfolgte ich die Gallotanninspaltung mit Hilfe von *Aspergillus niger* papierchromatographisch.

Die Versuchsbedingungen waren folgende:

Die Kulturflüssigkeit enthielt je Liter: 5 g Gallotannin („Merck“), 2,5 g KH_2PO_4 , 1,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 5,0 g NH_4NO_3 , 2 ml Metallsalzlösung. — Die Metallsalzlösung bestand aus: $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2,0 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 1,5 ml 1%ige Lösung, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 5 ml 1%ige Lösung, $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 1,5 ml 1%ige Lösung, konz. HCl 3 ml, Wasser auf 1 Liter.

Je 100 ml dieser Flüssigkeit wurden in Kankolben sterilisiert und dann mit Sporen von

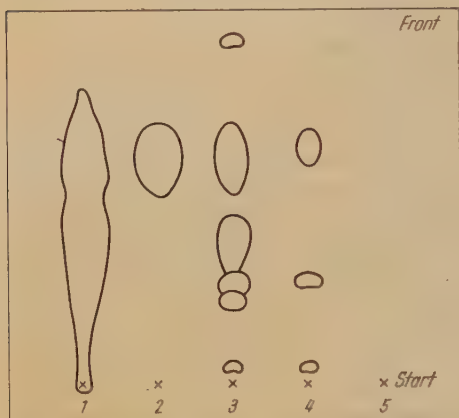


Abb. 1. Abbau von Gallotannin durch *Asp. niger*. Chromatogramm in Butanol/Essigsäure/Wasser. 1 Gallotanninlösung (unbeimpft); 2 Gallussäurelösung 3 Gallotanninlösung 3 Tage, 4 6 Tage, 5 9 Tage nach dem Beimpfen.

Aspergillus niger beimpft (Stamm XLI A₁). Das Wachstum erfolgte in Oberflächenkultur bei 27° C.

Bereits nach 2 Tagen hatte sich eine Myceldecke gebildet, die auch schon bald reichlich schwarzbraune Sporen trug. Nach 3, 6 und 9 Tagen wurde jeweils eine kleine Probe der Kulturflüssigkeit steril entnommen und in einer Menge von 60 μl auf Schl. u. Sch.-Papier 2043 b aufgetragen. Die Chromatographie erfolgte in aufsteigender Richtung mit dem Lösungsmittelgemisch n-Butanol (40) : Essigsäure (10) : Wasser (7). Als Vergleich wurden je 60 μl 0,5%ige Gallotanninlösung und 0,5%ige Gallussäurelösung aufgetragen. Zum Sichtbarmachen der Flecke wurde mit wäBriger FeCl_3 -Lösung (0,1% Fe^{+++}) besprüht.

Aus dem in Abb. 1 schematisch wiedergegebenen Chromatogramm ergibt sich, daß Gallotannin einen langen Schwanz bildet, während Gallussäure als wohldefinierter Fleck sichtbar wird. Nach 3 Tagen ist eine teilweise Spaltung des Gallotannins erfolgt, wobei sich neben Gallussäure noch phenolische Substanzen sowohl mit geringerem als auch mit größerem R_f -Wert gebildet haben. Nach 6 Tagen ist fast nur noch Gallussäure vorhanden, jedoch schon in geringerer Menge, nach 9 Tagen ist überhaupt kein Phenol mehr nachzuweisen.

Nach 10 Tagen wurde die Myceldecke abgehoben und mit Quarzsand und Wasser fein zerrieben. Im Filtrat war ebenfalls kein phenolischer Bestandteil nachzuweisen. Auch bei Verwendung organischer Lösungsmittel gelang ein solcher Nachweis nicht.

Aus den geschilderten Versuchen ging hervor, daß der Pilz in diesen Konzentrationen das Gallotannin schnell gespalten und auch die dabei gebildete Gallussäure entweder schnell abgebaut oder in eine völlig unlösliche Substanz übergeführt hatte.

Um diese Frage weiter zu verfolgen, setzte ich eine Reihe von Kulturen in gleicher Weise an, jedoch nicht mit Gallotannin als Kohlenstoffquelle, sondern mit reiner Gallussäure (*Acidum gallicum puriss.* „Schering“). Die chromatographische Prüfung wurde in gleicher Weise, wie oben beschrieben, vor-

genommen. Es zeigte sich dabei (Abb. 2), daß der Pilz mit Gallussäure als einziger Kohlenstoffquelle wachsen kann und die Gallussäure mit der gleichen Geschwindigkeit umsetzt wie Gallotannin.

In einer weiteren Versuchsreihe habe ich den Umsatz der Gallussäure durch *Aspergillus niger* mit Hilfe eines früher von mir (FRIEDRICH, 1954)

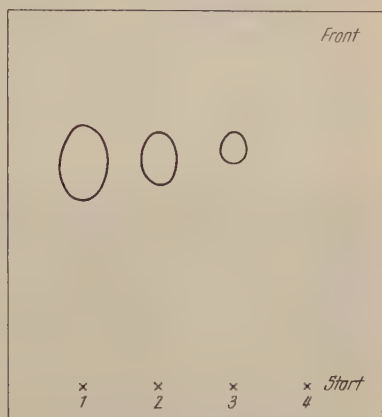


Abb. 2. Verbrauch von Gallussäure durch *Asp. niger*. Chromatogramm in Butanol/Essigsäure/Wasser. 1 Gallussäurelösung (unbeimpft); 2 Gallussäurelösung 3 Tage, 3 6 Tage, 4 9 Tage nach dem Beimpfen

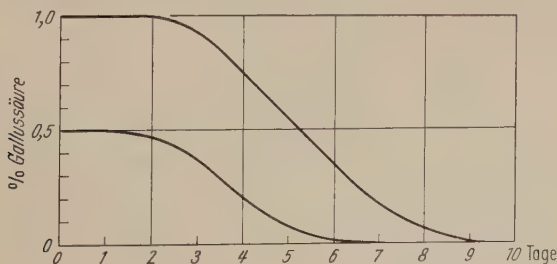


Abb. 3. Verbrauch von Gallussäure durch *Asp. niger* im Verlauf von 10 Tagen

ausgearbeiteten Verfahrens zur photometrischen Bestimmung der Gallussäure quantitativ verfolgt. Das Ergebnis zeigt Abb. 3, aus der hervorgeht, daß bei einer Kulturflüssigkeit, die 5 g Gallussäure je Liter enthielt, nach 7 Tagen, bei der doppelten Konzentration nach 10 Tagen, die Gallussäure völlig verbraucht ist.

Bereits NICHOLSON u. Mitarb. (1931) hatten ein Wachstum von *Aspergillus niger* auf Gallussäurelösung ohne weitere Kohlenstoffquelle beobachtet. In ihren Versuchen erwies sich darüber hinaus auch Pyrogallol als geeignet, das sie in einer Konzentration von 0,8% anwendeten.

Ich habe deshalb auch eine Versuchsreihe mit 0,5% iger und eine mit 1% iger Pyrogallollösung angesetzt und quantitativ ausgewertet. Die dabei erhaltenen Kurven stimmen weitgehend mit den entsprechenden Gallussäurekurven überein, so daß sie hier nicht wiedergegeben zu werden brauchen.

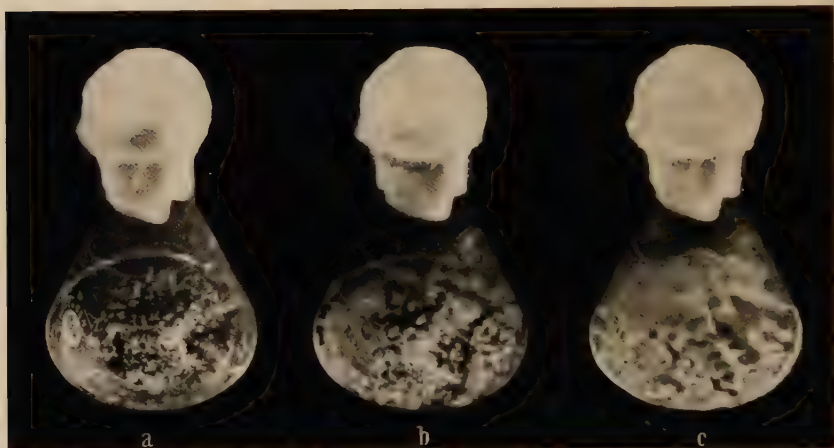


Abb. 4. Wachstum von *Asp. niger* mit Resorcin als einziger Kohlenstoffquelle a 1 Tag, b 2 Tage c 4 Tage nach dem Beimpfen


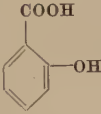
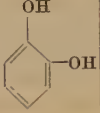
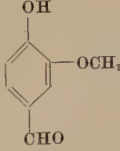
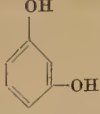
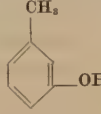

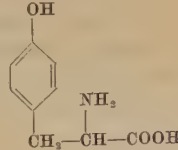
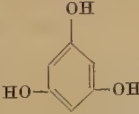


Da nunmehr bereits zwei phenolische Substanzen gefunden waren, die *Aspergillus niger* als einzige Kohlenstoffquelle dienen können, ergab sich die Frage, welche weiteren phenolischen Stoffe möglicherweise für den Pilz noch verwertbar sind. Aus der folgenden Übersicht geht hervor, welche Stoffe ich außer Gallussäure und Pyrogallol geprüft habe (je 0,5% ig) und zu welchem Ergebnis die Untersuchungen führten.

Auf Resorcinlösung zeigte sich schon am 1. Tag nach dem Beimpfen Mycelbildung, vom 2. Tag ab wurden Sporen gebildet, und in den folgenden Tagen nahm die Mycelbildung schnell zu (Abb. 4). Auf Hydrochinonlösung war das Wachstum gleichfalls deutlich, jedoch von etwas geringerer Intensität.

Die Beobachtung, daß Mikroorganismen phenolische Substanzen abbauen können, wurde schon vor längerer Zeit gemacht, jedoch handelte es sich bei den damals untersuchten Organismen vorwiegend um Bakterien. Aus Klärbecken isolierten FOWLER u. Mitarb. (1911) ein Bacterium (*B. helvolvus*), das bis zu 0,01 g Phenol in 100 ml Kulturmedium vertragen konnte und während des Wachstums verbrauchte. Auch das Verschwinden von Phenolen und Kresolen aus dem Boden wurde als mikrobiologischer Vorgang erkannt (SEN GUPTA, 1921), und STÖRMER

(1908), WAGNER (1914), TATTERSFIELD (1928) und GRAY u. THORNTON (1928) isolierten aus dem Boden Mikroorganismen, die eine Anzahl von Phenolen und Benzolabkömmlingen (Phenol, Resorcin, Phloroglucin, Kresole, Toluol, Xylol, Naphthalin) abbauen und als Kohlenstoffquelle ausnutzen konnten. TAUSSON (1927, 1928) nahm an, daß beim bakteriellen Phenanthrenabbau zuerst der mittlere Ring gespalten wird, wobei Phenole als Spaltprodukte auftreten, die aber ihrerseits weiter abgebaut werden. Jedenfalls waren die Bakterien in der Lage, auch Phenole, wie Brenzcatechin, Salicylsäure und Saligenin und zum Teil auch Hydrochinon und Phenol, als Kohlenstoffquelle auszunutzen. BERNHEIM (1942) fand ein nichtpathogenes *Mycobacterium*, das auf Benzoat, Oxybenzoat, Tyrosin und Phenol als einziger Kohlenstoffquelle wachsen konnte. Eine besondere Vorliebe für aromatische Stoffe hat *Azotobacter chroococcum*, von dem nach GUITTONNEAU u. CHEVALLIER (1936) verschiedene Stämme para-, ortho- und meta-Oxybenzoat verschieden angreifen. Das Bacterium bindet mit Benzoesäure als einziger C-Quelle gut Stickstoff und färbt dabei den Nährboden kohlschwarz, ebenso 2,4-Dinitrophenol (FISCHER, 1949; RADLER, 1955). Endlich können *Nocardia*-Arten aromatische Stoffe verwerten (v. PLOTHO, 1948, WOLMER, 1949; KÜSTER, 1953/54).

Tabelle 1

Substrat		Wachstum	Substrat		Wachstum
Phenol . . .		-----	Salicylsäure		-----
Brenzcatechin . .		-----	Vanillin .		-----
Resorcin .		++++	m-Kresol .		-----
Hydrochinon		+++	Tyrosin .		(+)
Phloroglucin		(+)	Chinon . .		-----
Benzoessäure		-----			

Auch über die Frage, auf welche Weise der Abbau der Phenole erfolgt und wie im besonderen die Spaltung des an und für sich sehr stabilen Benzolringes eintritt, liegt eine Reihe von Untersuchungen vor.

HAPPOLD u. RAPER (1925) sowie HAPPOLD (1930) fanden in zahlreichen Bakterien ein Brenzcatechin-Oxydase-System, mit dessen Hilfe in Gegenwart von Sauerstoff Brenzcatechin in o-Benzochinon übergeführt wurde. In experimentell angelegten Klärbecken konnten HAPPOLD u. KEY (1932) eine stark oxydasepositive Bakterienflora selektionieren und isolierten schließlich einen bestimmten Typ, den sie *Vibrio 0/1* nannten. Dieser Organismus verwendete Phenol als einzige Kohlenstoffquelle, und als Endprodukte des Abbaues traten Ameisen- und Essigsäure auf. In diesen Versuchen ließ sich erstmalig als Zwischenprodukt des Phenolabbaues eine Ketosäure nachweisen, die nicht mit Acetessigsäure identisch war. Die ersten Abbaustufen sollen nach EVANS u. HAPPOLD (1939), HAPPOLD (1940) und NELSON u. DAWSON (1944) Brenzcatechin und o-Benzochinon sein. KILBY (1948, 1951) gelang es dann, die Ketosäure zu isolieren und zu identifizieren. Aus der Kulturflüssigkeit eines auf Phenol gewachsenen Vibrios, die eine positive Rothera-Reaktion (Reaktion mit Nitroprussidnatrium auf Ketone und Ketosäuren) gab, erhielt er nach Perkolation mit Äther Lävulinsäure. Als native Vorstufe für diese vermutete er β -Keto adipinsäure, die leicht durch Decarboxylierung in Lävulinsäure übergeht. Schließlich konnte er auch bei vorsichtiger Ätherextraktion β -Keto adipinsäure kristallin erhalten und durch Mischschmelzpunkt mit synthetischer Substanz identifizieren. Er schlug folgendes Abbauschema für Phenol vor: Phenol \rightarrow Brenzcatechin \rightarrow o-Benzochinon \rightarrow 1,2,5-Trioxybenzol \rightarrow 5-Oxy-o-Benzochinon \rightarrow β -Keto adipinsäure \rightarrow Bernsteinsäure + Essigsäure. Auch für andere phenolische Stoffe, wie Protocatechusäure (EVANS, PARR u. EVANS, 1949), Mandelsäure, Benzoesäure und p-Oxybenzoesäure (STANIER 1948, 1950, sowie STANIER u. Mitarb., 1950), wurde der bakterielle Abbau über β -Keto adipinsäure nachgewiesen. Aus Kulturen von *Pseudomonas fluorescens* gelang PARR, EVANS u. EVANS (1949) die Isolierung des ringspaltenden Ferments, das zur Bildung von β -Keto adipinsäure führt. SISTROM u. STANIER (1954) fanden dagegen zwei Fermente, die bei der Überführung der von ihnen ermittelten Vorstufe cis-cis-Muconsäure in β -Keto adipinsäure mitwirken. Eine Literaturzusammenstellung bis zum Jahre 1950 über die Oxydation aromatischer Ringe durch Mikroorganismen (Bakterien) im Stoffwechsel hat HAPPOLD (1950) gegeben.

Bei einem Vergleich der phenolischen Stoffe, die den Bakterien als Kohlenstoffquelle dienen können und über die Stufe der β -Keto adipinsäure abgebaut werden, mit den Phenolen, auf denen der von mir untersuchte Stamm *Aspergillus niger* wachsen konnte, fällt auf, daß dem Pilz lediglich bereits stärker oxydierte Phenole als Substrat dienen können¹. Dabei ist offenbar Voraussetzung, daß zwei phenolische OH-Gruppen vorhanden sein müssen, die entweder in m- oder in p-Stellung zueinander stehen (m-OH-Gruppen in Resorcin, Pyrogallol und Gallussäure, p-OH-Gruppen in Hydrochinon).

Zur Klärung der Frage, auf welche Weise die in Betracht kommenden Phenole im Stoffwechsel des Pilzes abgebaut werden, war zu untersuchen, ob in der Kulturflüssigkeit des auf Phenolen wachsenden Pilzes

¹ Nach WATERMANN (1912) und LOHMANN (1934) kann Phenol in sehr geringer Konzentration diesem Pilz als C-Quelle dienen.

ebenso wie in den Bakterienkulturen Lävulinsäure bzw. β -Ketoadipinsäure auftritt.

Hierfür wurde eine ähnliche Versuchsanordnung gewählt, wie sie von verschiedenen Autoren zur Aufklärung der Bildung von Essigsäure und Brenztraubensäure (CHUGTAI, PEARCE u. WALKER, 1950), von Citronensäure, Oxalsäure und Gluconsäure (BERNHAEUER, 1928; CHUGTAI u. WALKER, 1951) und von Brenztraubensäure, Dimethylbrenztraubensäure und α -Ketoglutarsäure (WALKER u. Mitarb., 1951, HALL u. WALKER, 1953; RAMACHANDRAN u. RADHA, 1955) durch *Aspergillus niger* verwendet worden ist.

Die Kulturflüssigkeiten, die 1% Gallussäure, Pyrogallol, Resorcin oder 0,5% Hydrochinon und außerdem die oben angegebenen Nährsalze und Metallsalze enthielten, wurden zu je 100 ml in Kantkolben sterilisiert, die am Boden seitlich einen mit Schlauch und Schlauchklemme verschlossenen Ansatz zum Ablassen der Flüssigkeit besaßen. Nach dem Beimpfen mit Sporen von *Aspergillus niger* XLI A₁ ließ ich die Kolben so lange im Brutschrank bei 27° C stehen, bis sich eine kräftige Myceldecke ausgebildet hatte. Das war nach 6—7 Tagen der Fall. Nach dieser Zeit wurde die Kulturflüssigkeit durch den Ansatz abgelassen und durch die gleiche Menge steriles dest. Wasser ersetzt, um die restlichen Bestandteile der ersten Kulturflüssigkeit auszuwaschen. Nach 12 Std wurde das Washwasser durch 100 ml einer zweiten Kulturflüssigkeit ersetzt, die wie folgt zusammengesetzt war: 1/15 m Phosphatpuffer (pH 6), 0,004 m Kaliumarsenit und 1% Gallussäure (Pyrogallol, Resorcin) bzw. 0,5% Hydrochinon. Nach abermaligem Stehen bei 27° C wurden von Zeit zu Zeit Proben entnommen und papierchromatographisch auf das Auftreten von Ketosäuren geprüft.

Zur Papierchromatographie der Ketosäuren sind die verschiedensten Verfahren angegeben worden. Hier hat sich am besten die Methode von ISHERWOOD u. CRUTCHSHANK (1954; siehe auch RANSON, 1955) bewährt, die darauf beruht, daß man zunächst die 2,4-Dinitrophenylhydrazone der Ketosäuren herstellt und diese dann chromatographiert. Unter geringer Abwandlung dieses Verfahrens ging ich wie folgt vor: Jeweils 1 ml Kulturflüssigkeit wird mit 2,5 ml 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagens (0,2%ige Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 0,2 n äthanolischer Salzsäure) versetzt und 30 min bei 30° C aufbewahrt. Dabei bleiben die gebildeten 2,4-Dinitrophenylhydrazone in Lösung. 50 μ l dieser Lösung werden auf Schl.- u. Sch.-Papier 2043 b aufgetragen und mit der organischen Phase des Lösungsmittelgemisches iso-Amylalkohol (50) : Äthanol (10) : Wasser (40) in aufsteigender Richtung chromatographiert. Das Papier muß vorher mit 0,05 m Phosphatpuffer auf pH 8 gepuffert werden. Als Vergleichssubstanz diente Lävulinsäure (*Acidum laevulinicum purum pro injectione* „Merck“) in 0,025 m Lösung. Das Auftreten von β -Ketoadipinsäure kann bei dieser Methodik nicht erkannt werden, weil sie bei der Behandlung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin das entsprechende Hydrason der Lävulinsäure liefert. Die Flecke der stark gelb gefärbten 2,4-Dinitrophenylhydrazone sind auf dem Chromatogramm ohne weitere Behandlung gut sichtbar. Das überschüssige Reagens stört die Chromatographie nicht, da es kurz hinter der Lösungsmittelfront läuft.

Die chromatographische Prüfung der zweiten Kulturflüssigkeiten auf Ketosäuren führte zu folgendem Ergebnis: Nach 5tägigem Stehen werden in den Kulturen, die Gallussäure und Pyrogallol enthalten, keine Ketosäuren gefunden; die Hydrochinon- und die Resorcinkulturen liefern einen sehr deutlich ausgeprägten Fleck, der in seinem R_f-Wert mit dem des 2,4-Dinitrophenylhydrazons der Lävulinsäure übereinstimmt.

Auch bei den später erfolgten Probenahmen aus den Gallussäure- und den Pyrogallolkulturen läßt sich keine Ketosäure nachweisen. Dagegen nimmt die Intensität der bei den Hydrochinon- und Resorcin-kulturen beobachteten Flecke bis zum 15. Tag zu, darüber hinaus nicht mehr.

Aus den papierchromatographischen Untersuchungen über den Verbleib der phenolischen Substanzen nach 15 Tagen ergab sich das folgende Bild: Gallussäure bleibt in der Flüssigkeit der arsenitgehemmten Kulturen unverändert erhalten, außer ihr treten keine anderen Stoffe mit Phenol-Charakter auf. Pyrogallol ist noch vorhanden, daneben zeigen sich zwei weitere Flecke mit kleineren R_f -Werten, die beide sowohl mit FeCl_3 als auch mit diazotierter Sulfanilsäure wie Phenole reagieren. Diese Flecke treten jedoch auch bei unbeimpften Pyrogallollösungen auf und sind nicht auf die Tätigkeit des Pilzes zurückzuführen. Hydrochinon ist völlig verschwunden. Kurz über dem Startpunkt tritt ein Fleck auf, der die gleichen Reaktionen gibt, wie sie für Chinone beschrieben werden (im sichtbaren Licht rosa-violett, mit NH_3 -Dampf verstärkt, mit FeCl_3 stärker violett). Von Resorcin ist noch ein geringer Rest vorhanden. Außerdem tritt der gleiche Fleck auf, wie bei Hydrochinon beschrieben, und noch ein zweiter mit den gleichen Reaktionen, jedoch mit einem etwas größeren R_f -Wert.

Aus diesen Befunden kann man schließen, daß der Abbau der Gallussäure und des Pyrogallols offenbar Decarboxylierungsreaktionen erfordert, die durch die Hemmung mit Arsenit nicht ablaufen können. Hydrochinon und Resorcin werden in einem sehr ähnlichen oder identischen Mechanismus vermutlich über die Stufe von Chinonen zu einer Ketosäure abgebaut. Bei dieser Ketosäure handelt es sich offenbar entweder um Lävulinsäure oder um β -Keto adipinsäure, die beide das gleiche 2,4-Dinitrophenylhydrazon geben.

Im folgenden wurde versucht, Lävulinsäure-2,4-dinitrophenylhydrazon eindeutig nachzuweisen und eventuell auch β -Keto adipinsäure zu isolieren.

Dazu wurden in der oben beschriebenen Weise 2 Liter-Kulturen sowohl mit Hydrochinon als auch mit Resorcin angesetzt. Nachdem in den zweiten Kulturflüssigkeiten papierchromatographisch keine Phenole mehr nachgewiesen werden konnten, wurde die Kulturflüssigkeit abgezogen, zentrifugiert und im Vakuum bei einer 37°C nicht übersteigenden Temperatur auf ein Volumen von etwa 50 ml eingengt. Entsprechend den Angaben von STANIER u. Mitarb. (1950) wurde dieser Rückstand mit Ammoniumsulfat gesättigt, mit Schwefelsäure auf pH 2,3 angesäuert und 40mal mit je etwa 50 ml Äther ausgeschüttelt. Der Äther wurde mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum verdampft und der Rückstand mit wenig Äthylacetat aufgenommen. Weder nach längerem Stehen im Eisschrank noch durch Zusatz von Petroläther konnte ich Kristalle von β -Keto adipinsäure gewinnen. Nach Zusatz von salzsaurer 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung zu dem Rückstand von der Ätherextraktion fiel jedoch ein Niederschlag aus, der nach mehrfacher Reinigung rein gelb wurde und unter dem Heitzischmikroskop nach BOETIUS einen

Schmelzpunkt von 203° C zeigte. Authentisches 2,4-Dinitrophenylhydrazon der Lävulinsäure schmolz ebenfalls bei 203° C, im Gemisch trat keine Schmelzpunktsdepression ein.

Ich konnte somit nachweisen, daß das papierchromatographisch ermittelte 2,4-Dinitrophenylhydrazon tatsächlich die entsprechende Verbindung der Lävulinsäure war. Nach den Erfahrungen, die bei der Isolierung der β -Keto adipinsäure aus Bakterienkulturen gemacht worden sind (KILBY, 1948, 1951; STANIER u. Mitarb., 1950), muß angenommen werden, daß auch in den Kulturflüssigkeiten des auf Hydrochinon oder Resorcin gewachsenen Pilzes β -Keto adipinsäure und nicht Lävulinsäure gebildet wird. Gleichzeitig entstehen offenbar Substanzen, die die Kristallisation hemmen, so daß man die β -Keto adipinsäure nur in Form des 2,4-Dinitrophenylhydrazons der Lävulinsäure abscheiden kann.

Als Abbauprodukt der β -Keto adipinsäure kommen auch im Falle von *Aspergillus niger* Bernsteinsäure und Essigsäure in Betracht, die ihrerseits in den Tricarbonsäurecyclus eingehen, der nach den Untersuchungen von RAMAKRISHNAN u. MARTIN (1954) bei *Aspergillus niger* vollständig ablaufen kann.

Zusammenfassung

Es wurde gezeigt, daß *Aspergillus niger* XLI A₁ mit Gallussäure, Pyrogallol, Resorcin oder Hydrochinon als einziger Kohlenstoffquelle wachsen kann. Nach Arsenithemmung konnte aus den Resorcin- und Hydrochinonkulturen Lävulinsäure-2,4-Dinitrophenylhydrazon isoliert werden, das vermutlich aus β -Keto adipinsäure entstanden war. Der Abbaumechanismus der phenolischen Substanzen durch *Aspergillus niger* wird diskutiert.

Herrn Dr. A. RIETH, Gatersleben, danke ich für die Überlassung des verwendeten Pilzstammes, Herrn Dr. H. HOPMANN, Porz/Rh., für die Überlassung der Lävulinsäure, meiner lieben Frau sowie Fräulein LISA BRUHN für die Mithilfe bei der Ausführung der Versuche.

Literatur

- BERNHAEUER, K.: Biochem. Z. **197**, 287 (1928). — BERNHEIM, F.: J. of Biol. Chem. **152**, 481 (1942).
- CHUGTAI, M. J. D., A. A. PEARCE and T. K. WALKER: Biochemic. J. **47**, 135 (1950). — CHUGTAI, M. J. D., and T. K. WALKER: Biochemic. J. **48**, 524 (1951).
- EVANS, W. C., and F. C. HAPPOLD: J. Soc. Chem. Ind. **58**, 55 (1939). — EVANS, R. A., W. H. PARR and W. C. EVANS: Biochemic. J. **44**, VIII (1949).
- FERNBACH, A.: C. r. Acad. Sci. (Paris) **131**, 1214 (1900). — FISCHER, W.: Arch. Mikrobiol. **14**, 353 (1949). — FOWLER, G. J., E. ARDERN and W. T. LOCKETT: Proc. Roy. Soc. B. **83**, 149 (1911). — FRIEDRICH, H.: Pharmazie **9**, 138, 240 (1954).
- GRAY, P. H. H., u. H. G. THORNTON: Zbl. Bakter. II, **73**, 74 (1928). — GUITTONNEAU, G., u. R. CHEVALIER: C. r. Acad. Sci. (Paris) **203**, 1400 (1936).
- HALL, A. N., and T. K. WALKER: J. Gen. Microbiol. **9**, VI (1953). — HAPPOLD, F. C.: Biochemic. J. **24**, 1737 (1930); Rep. 3rd Int. Congr. Microbiol. **1940**, 220; Biochem. Soc. Sympos. No 5. Biological Oxidation of Aromatic Rings. Cambridge 1950.

— HAPPOLD, F. C., and A. KEY: *J. of Hyg.* **32**, 573 (1932). — HAPPOLD, F. C., and H. S. RAPER: *Biochemic. J.* **19**, 92 (1925).

ISHERWOOD, F. A., and D. H. CRUICKSHANK: *Nature (Lond.)* **173**, 121 (1954).

KESELING, J.: Untersuchungen über Tannin als einzige Kohlenstoffquelle für Mikroorganismen. Göttingen 1929; ref. Bot. Zbl. **16**, 166 (1930). — KILBY, B. A.: *Biochemic. J.* **43**, V (1948); **49**, 671 (1951). — KNUDSON, L.: *J. of Biol. Chem.* **14**, 159 (1913). — KÜSTER, E.: *Cbl. Bakt. I Orig.* **160**, 207 (1953/1954).

LOHMANN, G.: *Arch. Mikrobiol.* **5**, 31 (1934).

MARTIN, S. M.: *Canad. J. Microbiol.* **1**, 6 (1954); ref. *Ber. wiss. Biol.* **94**, 73 (1955).

NELSON, J. M., and C. R. DAWSON: *Adv. Enzymol.* **4**, 99 (1944). — NICHOLSON, W. N., M. NIERENSTEIN, J. C. POOL and N. V. PRICE: *Biochemic. J.* **25**, 752 (1931).

PARR, W. H., R. A. EVANS and W. C. EVANS: *Biochemic. J.* **45**, XXIX (1949). — PLOTHO, O. v.: *Arch. Mikrobiol.* **14**, 12 (1948). — POTTEVIN, H.: *C. r. Acad. Sci. (Paris)* **131**, 1215 (1900). — PRESCOTT, S. C., and C. G. DUNN: *Industrial Microbiology*, 2nd Ed. S. 630, New York, Toronto, London 1949.

RADLER, F.: *Arch. Mikrobiol.* **22**, 335 (1955). — RAMACHANDRAN, K., and V. RADHA: *Current Sci.* **24**, 50 (1955); ref. *Ber. wiss. Biol.* **98**, 237 (1955). — RAMAKRISHNAN, C. V.: *Enzymologia* **17**, 169 (1934). — RAMAKRISHNAN, C. V., and S. M. MARTIN: *Chem. a. Industr.* **1954**, 160; ref. *Biol. Abstr.* **29 D**, 424 (1955); *Arch. of Biochem. a. Biophysics* **55**, 403 (1955). — RANSON, S. L.: in PAECH-TRACEY: *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*. II. Band. S. 573 ff, Berlin 1955. — RIPPEL, A.: *Arch. Mikrobiol.* **11**, 1 (1940). — RIPPEL, A., u. J. KESELING: *Arch. Mikrobiol.* **1**, 60 (1930). — RIPPEL-BALDES, A., u. J. PETERS: *Arch. Mikrobiol.* **14**, 203 (1949).

SCHEELE, K.: *Crell's Chem. Ann.* **1**, 3 (1787); zit. nach PRESCOTT u. DUNN (1949). — SEN GUPTA, N. N.: *J. Agric. Sci.* **2**, 136 (1921). — SISTROM, W. R., and R. Y. STANIER: *J. of Biol. Chem.* **210**, 821 (1954). — STANIER, R. Y.: *J. Bacteriol.* **55**, 477 (1948); **59**, 117, 129, 137, 527 (1950). — STANIER, R. Y., B. P. SLEEPER, M. TSUCHIDA and D. L. MACDONALD: *J. Bacter.* **59**, 137 (1950). — STÖRMER, K.: *Zbl. Bakter. II* **20**, 282 (1908).

TATTERSFIELD, F.: *Ann. Appl. Biol.* **15**, 57 (1928). — TAUSSON, W. O.: *Planta* **4**, 214 (1927); **5**, 239 (1928). — TIEGHEM, Ph. E. L. VAN: *Ann. des Sci. natur. Bot. Ser.* **5**, Bd. 8, 240 (1867); *C. r. Acad. Sci. (Paris)* **65**, 1091 (1867).

WAGNER, R.: *Z. Gärungsphysiol.* **4**, 289 (1914). — WALKER, T. K., A. N. HALL and J. W. HOPTON: *Nature (Lond.)* **168**, 1042 (1951). — WATERMANN, H.: *Fol. Microbiol.* **1**, 422 (1912). — WOLMER, C.: *Z. Hyg.* **129**, 643 (1949).

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen)

Über einige neue Chytridineen aus Erdboden (*Olpidium*, *Rhizophidium*, *Phlyctochytrium* und *Rhizophlyctis*)

Von

ESTHER-RUTH UEBELMESSER

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 21. Juli 1956)

Bei der Untersuchung von Bodenproben vom Meeresstrand auf ihren Gehalt an niederen Phycomyceten (HARDER u. UEBELMESSER, 1955) wurden vier neue Arten aus den Gattungen *Olpidium*, *Rhizophidium*, *Phlyctochytrium* und *Rhizophlyctis* gefunden. Die Pilze fanden sich später zum Teil auch in Erdproben aus Australien und Nordamerika. Zwei weitere neue Arten von *Rhizophidium* und *Phlyctochytrium* wurden aus Bodenproben von Australien und Nordamerika isoliert.

1. *Olpidium longicollum* n. spec.

Vorkommen: Die Art, bisher von HARDER u. UEBELMESSER (1955) als *Olpidium* spec. bezeichnet, trat an verschiedenen Standorten des bewachsenen und unbewachsenen Meeresstrandes, niemals submers, auf, und zwar in mediterranen Proben (Lido von Venedig, Elba, Jugoslawien und Costa Brava in Spanien) und in Erden von Spiekeroog. Später wurde sie auch noch in vielen australischen Erdproben, die nicht vom Strand stammten, gefunden. Sie kann zu den häufigen niederen Phycomyceten gerechnet werden.

Bei den Bodenproben vom Strand erschien der Pilz sowohl in Süßwasser- wie in Seewasseransätzen. Die Ansätze wurden in der üblichen Weise durchgeführt: eine Spatelspitze Boden wurde in einer Petrischale mit Wasser überschichtet, mit Pollen beködert und im Thermostaten bei 22° C bebrütet (vgl. HARDER u. UEBELMESSER, 1955). Meistens zeigte sich bei Durchsicht der Schalen schon nach ungefähr fünf Tagen eine starke Infektion des Pollens mit den endobiotisch lebenden Sporangien, die besonders durch einen sehr langen Entleerungshals auffielen. Einzelne Pollenkörner mit je einem Sporangium wurden auf die von GAERTNER (1954) beschriebene Weise isoliert; so wurde der Pilz in Esmarschalen auf Pollen weiterkultiviert.

Die Infektion der Pollenkörner erfolgte durch Zoosporen, die sich zunächst auf der Membran des Pollens festsetzten, diese durchwuchsen und dann im Innern des Pollens zu einem kleinen, fast kreisrunden Bläschen anschwellen. Nur in seltenen Fällen drangen zwei Zoosporen in ein Pollenkorn ein. In dem Bläschen sonderten sich zwei bis drei stark lichtbrechende Körper aus (wohl Öltropfen). Im Laufe von zwei Tagen

wuchsen die Bläschen zu meist ovalen, manchmal unregelmäßig abgeplatteten, rundlichen Sporangien heran; ihre Membran war glatt und zart, ihr Plasma feinkörnig, ihre Granula von ungleicher Größe, aber gleichmäßig verteilt. In diesem Stadium waren die Sporangien etwa $40 \times 50 \mu$ groß. Jetzt begannen sie mit der Ausbildung des für die Art typischen Entleerungshalses, der die Pollenwand durchwuchs und in zwei bis drei Stunden seine volle Länge von 80μ (in extremen Fällen 200μ) erreichte (Abb. 1a). Das Plasma dieser Papille war kaum granuliert, fast hyalin, ihre Membran war glatt und dünn und an der Spitze war sie gallertig verquollen. Der Durchmesser des Entleerungshalses war $10-12 \mu$. Wenn er fertig ausgebildet war, teilte sich das Plasma des Sporangiums in regelmäßige Portionen auf, die sich zu rundlichen Zoosporen ausdifferenzierten. An ihnen konnte man schon im Sporangium zwei stark lichtbrechende Körperchen erkennen, die Globuli (Abb. 1b). Nach Auflösen des Gallertpfropfens schwärmten die Zoosporen einzeln durch die runde Öffnung aus, die ersten langsam, die folgenden immer schneller; dabei kamen amöboide Formveränderungen vor. Frei im Wasser schwimmend wurden die Zoosporen kugelförmig, hatten einen Durchmesser von 10μ und waren opisthokont; die Geißel war $80-90 \mu$ lang. Die Lage der Globuli in den Zoosporen war nicht sicher fixiert, meist lagen sie aber dem Geißelinsertionspunkt gegenüber und immer beide Globuli dicht beisammen (Abb. 1b). Nach zwei Wochen fanden sich fast nur noch leere Zoosporangien und Dauersporangien in der Kultur. Die Dauersporangien (Abb. 1c) waren rund, hatten eine dicke, glatte Membran und waren mit dichtem, grob granuliertem Plasma ausgefüllt, in dem mehrere Reservestoffkörper verschiedener Größe und verschieden starker Lichtbrechung lagen. Sie konnten zwei bis drei Monate überdauern und dann nach Übertragung in frisches Wasser mit sterilem Pollen auskeimen.

Auf Grund seines endobiotischen, holokarpen Thallus, dem ein spezielles vegetatives System fehlt, und der als Ganzes in ein einziges, unbedeckeltes Sporangium oder eine Dauerspore eingeht, sowie wegen seiner opisthokonten Zoosporen gehört der Pilz zu *Olpidium*. Er ist von den bereits bekannten *Olpidium*-Arten durch seinen auffallend langen Entleerungshals, die Größe der Zoosporen sowie durch das Vorhandensein von zwei Globuli in jeder Zoospore verschieden.

Am nächsten steht er *Olpidium brassicae*; die Einreihung als solches kommt aber, da er nicht parasitisch wächst und die Größenverhältnisse andere sind, nicht in Frage. Von *Olpidium luxurians* Fischer, dem der Pilz ebenfalls nahe steht, unterscheidet er sich durch sein Vorkommen in Einzahl im Pollenkorn, seinen stark extramatrikal verlängerten Entleerungshals und die Zoosporengröße. Der lange Entleerungshals von *Olpidium allomyces* Karling (1948) ließ zuerst vermuten, daß der Pilz trotz anderer Größenverhältnisse dieser Art zugeordnet werden könnte. Infektionsversuche mit unserem *Olpidium* an *Allomyces*-Sporangien gelangen aber nicht. Auch sind bei *Olpidium allomyces* in den Zoosporen viele Globuli.

Der Pilz wurde $2\frac{1}{2}$ Jahre lang auf Pollen sowohl in Süßwasser als auch in Seewasser (Salzkonzentration 3,2%) kultiviert, ohne morphologische Veränderungen zu zeigen. Er sei wegen seines auffällig langen Entleerungshalses *Olpidium longicollum* genannt.

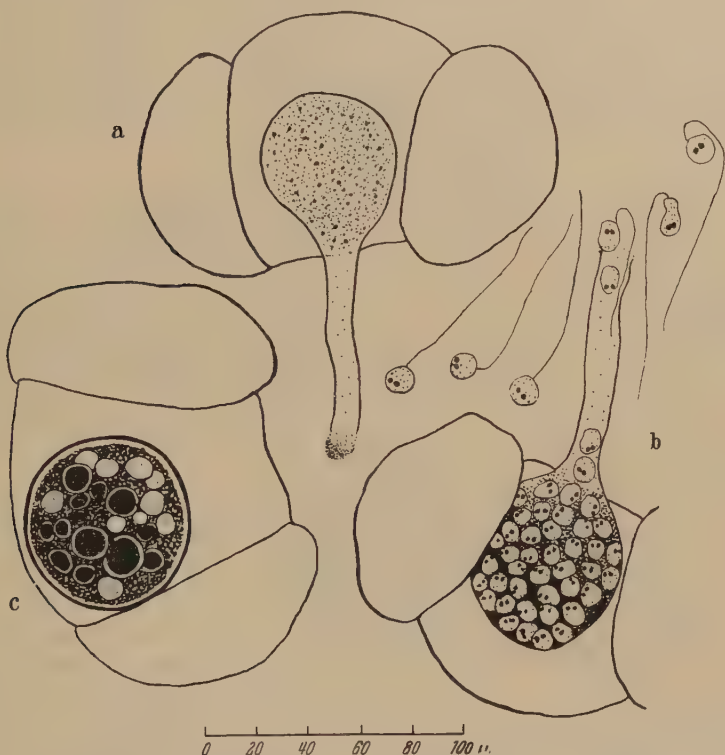


Abb. 1. *Olpidium longicollum* n. sp. a Junges Sporangium in *Pinus*pollen. b Schwärmer entlassendes Sporangium. c Dauersporangium. Vergr. 500 ×

Olpidium longicollum n. spec.

Zoosporangien oval bis rund, manchmal unregelmäßig abgeplattet, $50\text{--}60\ \mu$ breit und $60\text{--}80\ \mu$ lang, glattwandig, mit einer $80\text{--}200\ \mu$ langen Papille. Inhalt des Zoosporangiums zuerst fein granuliert, später Schwärmer ausdifferenziert. Entwicklung holokarp und endobiotisch. Zoosporen rund, $10\ \mu$ im Durchmesser mit hinten inserierter, $80\ \mu$ langer Geißel; Bewegung im Wasser huschend-schnellend. Dauersporangien rund, $60\text{--}70\ \mu$ im Durchmesser, mit glatter Wand, zahlreichen, verschieden großen Öltropfen und grob granuliertem Plasma. Saprophytisch in sterilisierten *Pinus*pollen.

2. *Rhizophidium halophilum* n. spec.

Vorkommen: Diese Chytridinee, ein *Rhizophidium*, wurde erstmalig aus Proben des Strandes vom Lido von Venedig isoliert. Später wurde es als die häufigste der pollenbefallenden Chytridineen aller Strandproben von Nord- und Ostsee sowie dem Mittelmeer gefunden und wurde schließlich auch aus Erdproben von Salzstandorten in Nordamerika (Salt Lake, Utah) herausgeködert. Da es vor allem in Seewasseransätzen auftrat, wurde es von HARDER u. UEBELMESSER (1955) „*Rhizophidium* spec. (*halophil*)“ genannt. Es kam gelegentlich allerdings auch mit großer Häufigkeit in Ansätzen mit Süßwasser vor. Dies war vor allem bei den Proben vom Lido von Venedig der Fall, die (vielleicht nach einer längeren Trockenzeit) selbst genügend Salzkristalle enthalten mochten, so daß auch in den Süßwasseransätzen wohl eine gewisse Salzkonzentration herrschte.

Bereits fünf Tage nach der Beköderung traten auf den Pollen kreisrunde Sporangien von 60—80 μ Durchmesser auf, die nach der Literatur nicht-näher bestimmt werden konnten. Sie fielen durch ihre regelmäßig angeordneten, zahlreichen Papillen sowie durch ihren zu einem gleichmäßigen Muster angeordneten Inhalt auf (Abb. 2e): Die Zoosporen lagen als stark lichtbrechende Kugeln im Innern des Sporangiums und machten etwa den Eindruck einer gläsernen Beere im Sporangium. Mit solchen Sporangien befallene Pollenkörner wurden in frisches Seewasser mit sterilem Pollen übertragen; dadurch wurden artreine Kulturen gewonnen.

Die Zoosporen, die sich auf den Pollenkörnern festsetzten, wuchsen zu einer runden Blase aus, die ein deutlich sichtbares Rhizoid, das aus einem Hauptstamm und davon abgehenden Verzweigungen bestand, in das Pollenkorn hineinschickte (Abb. 2a, b). Der Inhalt der Blase, der zuerst hyalin, dann fein granuliert war, zeigte bald einen großen, dann viele Öltropfen verschiedener Größe, die fast das ganze Sporangium ausfüllten, solange es seine endgültige Größe noch nicht erreicht hatte. 24 Std nach dem Auskeimen der Zoospore war das Sporangium ausgewachsen, die Öltropfen lagen lose verteilt im hyalinen Plasma, und es waren 25-30 Papillen von 5—6 μ Länge und 4 μ Durchmesser ausgebildet (Abb. 2c). Während weiterer 8 Std verteilten sich die Öltropfen zu sehr feinen Tröpfchen; in diesem Stadium konnte man die Papillen auch in der Aufsicht auf das kugelige Sporangium sehen (Abb. 2d), während sie sonst nur im Profil an der Peripherie erkennbar waren (Abb. 2e). Am Ende des zweiten Tages war das Sporangium schwärmreif (Abb. 2e). Die Papillen verquollen, und die Zoosporen traten einzeln, durch mehrere Papillen gleichzeitig, aus (Abb. 2f); einzelne Papillen schienen zum Ausschwärmen bevorzugt zu werden, auch konnte nicht beobachtet werden, daß alle Papillen zum Schwärmen benutzt wurden. Die Zoosporen schwammen nach dem Ausschlüpfen, bei dem sie sich etwas in die Länge streckten, sofort mit großer Geschwindigkeit unter ruckartigen Bewegungen weg; sobald ein Teil der Zoosporen

das Sporangium verlassen hatte, gerieten die noch in ihm befindlichen in sehr rasche Bewegung. Der ganze Ausschwärmakt dauerte höchstens 10 min. Manchmal verblieb eine einzelne Zoospore im Sporangium, heftete sich innerhalb der leeren Membran am Pollenkorn fest

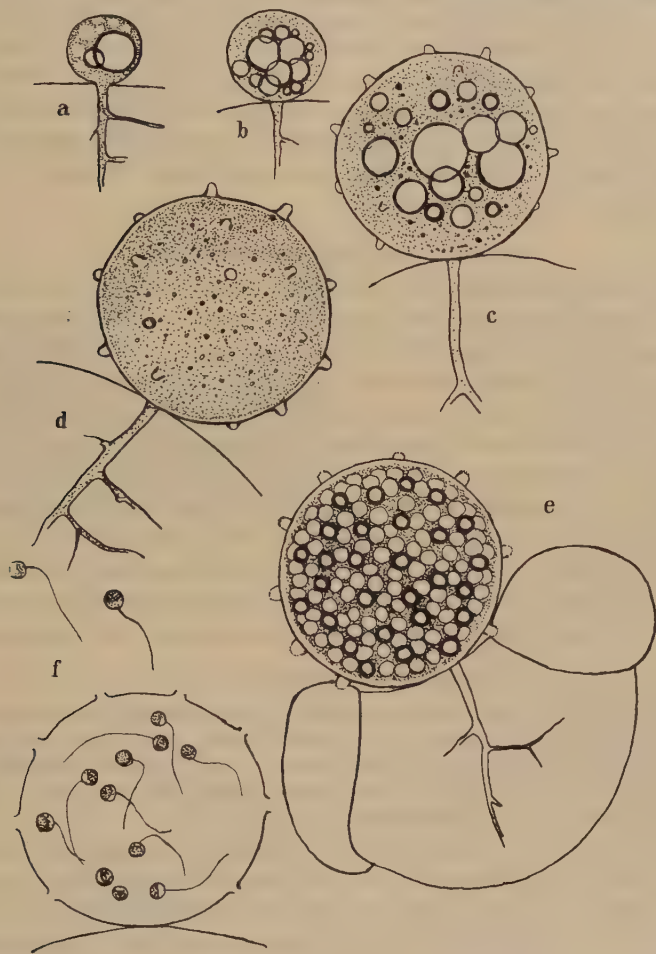


Abb. 2. *Rhizophidium halophilum* n. sp. a—e Sporangienentwicklung auf *Pinus*pollen.
f Entleertes Sporangium und Schwärmer. Vergr 500 ×

und keimte aus. Die Zoosporen waren rund, $5,5\text{--}6\ \mu$ im Durchmesser und hatten keinen Globul. Das fein granulierte Plasma zeigte auf der Seite des Geißelinsertionspunktes einen deutlich abgegrenzten helleren Halbmond. Die Geißel, eine Peitschengeißel nach COUCH (1941), war $30\ \mu$ lang und in der Bewegungsrichtung hinten inseriert. Dauersporangien wurden in

den 2 Jahren, während der der Pilz in artreiner Kultur gehalten wurde, nicht gebildet; auch nicht, wenn er bis zu einem halben Jahr im selben Substrat verblieb.

Das *Rhizophidium* unterscheidet sich von den bereits bekannten Arten durch die Vielzahl und die regelmäßige, fast ornamentartig wirkende Anordnung seiner Papillen und, im schwarmreifen Stadium, auch seines Sporangieninhalts. Ein zweites wichtiges Unterscheidungsmerkmal ist das Fehlen des Globuls in den Zoosporen.

Die Art blieb durch viele Generationen während 2½ Jahren morphologisch unverändert und bewahrte auch in den verschiedenen Salzkonzentrationen der Nord- und Ostsee sowie des Mittelmeeres ihre typische Form. Sie sei wegen ihrer ausgesprochenen Halophilie *Rhizophidium halophilum* n. spec. genannt.

Rhizophidium halophilum n. spec.

Sporangium kugelig, 60—80 μ im Durchmesser mit 25—30 regelmäßig angeordneten hyalinen Papillen von 5—6 μ Länge und 4 μ Durchmesser. Inhalt zuerst fein granuliert mit vielen eingelagerten verschieden großen Öltropfen, dann gröber granuliert und im schwarmreifen Zustand mit deutlich ausdifferenzierten, gleichmäßig runden, stark lichtbrechenden Zoosporen. Rhizoid kräftig ausgebildet mit Hauptstamm und davon abgehenden Verzweigungen. Zoosporen schwärmen einzeln nach Vergallertung der Papillen; die 30 μ lange, hinten inserierte Peitschengeißel wird schon im Sporangium ausgebildet. Durchmesser der Zoosporen 5,5—6 μ . Globul nicht vorhanden, Plasma der Zoosporen fein granuliert mit einem helleren Halbmond auf der Seite des Geißelinsertionspunktes. Kultivierbar auf Pollen in Seewasser verschiedener Salzkonzentration.

3. *Rhizophidium utriculare* n. spec.

Vorkommen: Das *Rhizophidium* wurde aus Erdproben von Australien isoliert, war an verschiedenen Standorten dort ziemlich häufig und konnte auf Pollen in artreine Kultur genommen werden. Später wurde es auch in salzhaltigen Erdproben aus Nordamerika gefunden. Es ist aber nicht speziell halophil, die australischen Erden stammten nicht von Salzstandorten.

Entwicklungsgang: Die Zoospore keimt zu einer kleinen Blase mit fein granuliertem Plasma und senkt ein zartes, kaum verzweigtes Rhizoid in das Pollenkorn (Abb. 3a). Die wenigen, nicht stark lichtbrechenden Inhaltskörper, die anfänglich in der Blase zu sehen sind, teilen sich beim Heranwachsen derselben immer mehr auf. Das Bläschen ist anfänglich rundlich, später oval, mit der schmalen Basis dem Pollenkorn aufsitzend. Beim weiteren Heranwachsen des Sporangiums nimmt dasselbe immer mehr birnenförmige Gestalt an (Abb. 3b, c), wird bis zu 120 μ lang und hat im oberen, bauchigen Teil einen Durchmesser von 80—100 μ . Vereinzelt trifft man auch fast kugelige Sporangien. Alle Sporangien enthalten fein granuliertes Plasma mit gleichmäßig verteilten größeren Granula. In der oberen Hälfte des Sporangiums bilden sich 3—7 große, uhrglasförmige

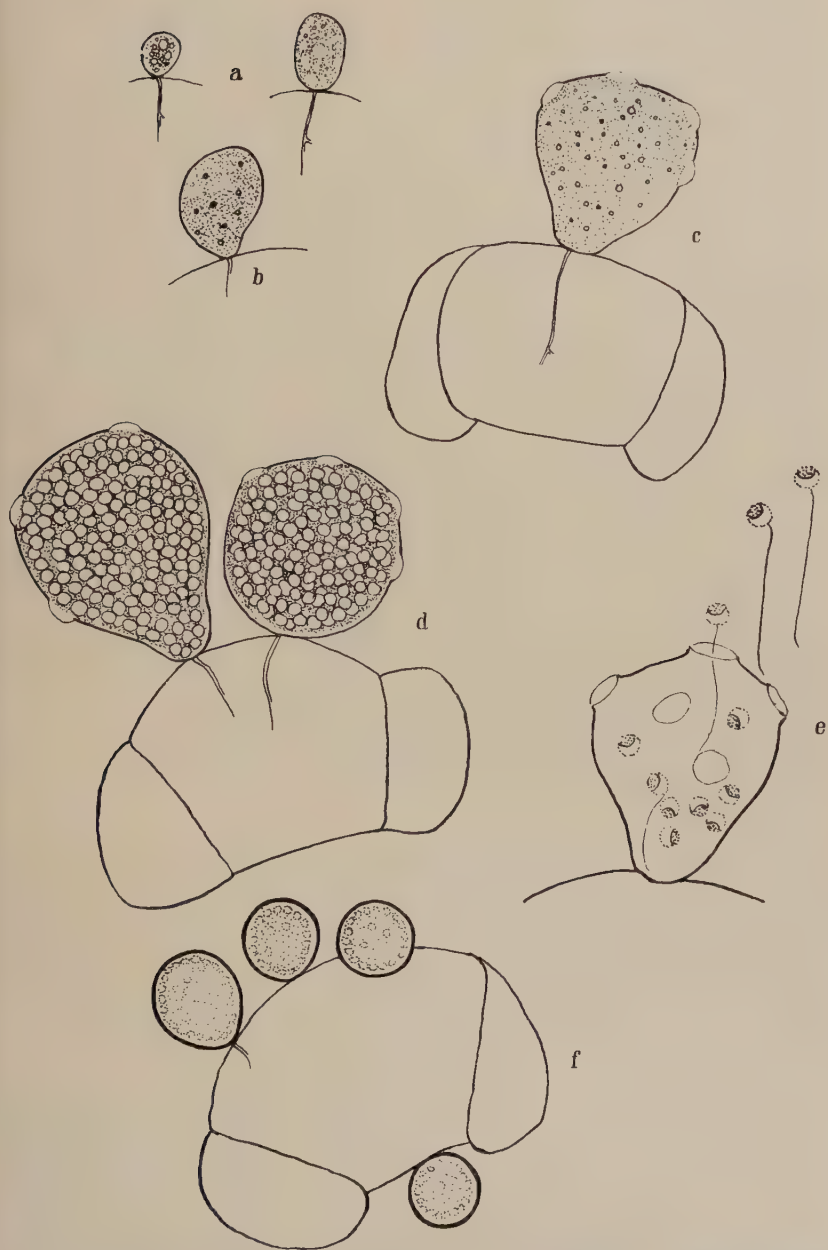


Abb. 3. *Rhizophidium utricularae* n. sp. *a—c* Entwicklung des Sporangiums. *d* Zwei schwarmreife Sporangien. *e* Schwärmer entlassendes Sporangium. *f* Dauersporangien. Auf *Pinuspollen*. Vergr. 500 ×

Papillen mit einem Durchmesser von 10μ aus (Abb. 3c). Die Entwicklung der Sporangien dauert etwa einen Tag, am zweiten Tag werden die Zoosporen im Sporangium ausdifferenziert (Abb. 3d). Nach Verquellen der Papillen schlüpfen Zoosporen von 8μ Durchmesser aus, deren Plasma im hinteren Teil hyalin ist; am vorderen Pol liegt ein grob granulierter Körper, den man aber seiner Granula wegen nicht als Globul ansprechen kann (Abb. 3e). Die Dauersporangien (Abb. 3f) sind verhältnismäßig klein (Durchmesser $25\text{--}30\mu$), meist rund, selten eiförmig, mit einer derben, glatten Membran und in kleine Kugeln aufgeteiltem Inhalt.

Dieses zweite *Rhizophidium* hat große Ähnlichkeit mit einem von KARLING (1938) beschriebenen, das er aber wegen der fehlenden Möglichkeit, die Gesamtentwicklung des Pilzes zu beobachten, nicht benannt hat. Bei KARLINGS Organismus fehlte die Ausbildung der Dauersporangien. Außerdem war bei KARLINGS Pilz das Vorherrschen der birnen- oder sackartigen Formen nicht so stark wie bei unserem Pilz; er war meist kugelig mit Durchmessern von $10\text{--}52\mu$. KARLING weist auf die Ähnlichkeit mit *Rh. agile*, *Rh. gibbosum*, *Rh. rostellatum* und *Phlyctochytrium biporosum* hin. Arten, von denen unser *Rhizophidium* in Form und Größe des Sporangiums sowie der Ausbildung der Zoosporen, denen auch hier der Globul fehlt, stark abweicht. Das *Rhizophidium pyriforme* Valkanov (1931) hat ebenfalls etwas Ähnlichkeit mit dem gefundenen Pilz, es werden aber dort gar keine Maße angegeben, auch wurden keine Zoosporen und keine Dauerstadien beobachtet; ferner fehlten den Sporangien die Papillen; es scheidet also ebenfalls aus. *Rhizophidium utriculus* Scherffel (1926), das in der Sporangienform etwa unserem Pilz entsprechen könnte, wenn auch die Sporangien dort sehr viel kleiner sind ($13\text{--}14\mu$ lang, $6\text{--}8\mu$ im Durchmesser), kommt auch nicht in Betracht, da es mit einer breiten apikalen Öffnung schwärmen soll. Angaben über Rhizoid und Schwärmer fehlen; SCHERFFELS Pilz ist deshalb bei SPARROW (1943) auch nicht in die Gattung eingeordnet.

Das *Rhizophidium* bewahrte konstant alle seine Merkmale in der Kultur. Wegen seiner sackförmigen Sporangien sei ihm der Artname *utriculare* gegeben.

Rhizophidium utriculare n. spec.

Sporangien sack- oder birnenförmig, selten rund, 120μ lang, $80\text{--}100\mu$ breit. Entwicklung streng monozentrisch, epi- und endobiotisch. Rhizoid sehr zart, kaum verzweigt. Zoosporen 8μ im Durchmesser, ohne Globul mit granuliertem Plasma am vorderen Pol und hyalinem Plasma um die Geißelinsertionsstelle. Geißel $60\text{--}70\mu$ lang, Bewegung der Zoosporen hüpfend. Schwärmerentlassung einzeln durch $3\text{--}7$ große Papillen. Sporangien meist einzeln, manchmal zu zweien auf einem Pollenkorn. Dauersporangien rund, $25\text{--}30\mu$ im Durchmesser, mit derber, glatter Membran und in kleine Kugeln aufgeteiltem Inhalt, bis zu sechs auf einem Pollenkorn.

4. *Phlyctochytrium spectabile* n. spec.

In Erdproben aus Nordamerika (Salt Lake City) wurde eine weitere Chytridinee isoliert, die zunächst für *Rhizophidium halophilum* n. spec. gehalten werden könnte, wenn man nur das schwarmreife Sporangium

vor sich hat. Doch ist das rhizoidale System stets mit einer Apophyse ausgebildet (Abb. 4). Der Pilz ist deshalb bei der Gattung *Phlyctochytrium* einzureihen. Er befiel Pollen in Süßwasseransätzen und entwickelte sich in Einzahl auf den Pollenkörnern. Seine Entwicklung ist für Phlyctochytrien typisch. Nach Anheften der Zoospore auf dem Pollenkorn wächst ein Keimschlauch in dasselbe, ein Öltropfen wandert darin an die später zur Apophyse werdende Stelle. Der Öltropfen verteilt sich in viele kleine Tröpfchen, die Apophyse schwillt, während gleichzeitig das Sporangium außerhalb des Pollenkorns anwächst; in ihm bilden sich ein, später bis zu drei große Öltropfen (Abb. 4a). Ohne daß eine Phase, in der das Plasma gleichmäßig granuliert ist, dazwischen liegt, werden die Zoosporen ausdifferenziert, die hier ähnlich wie bei *Rhizophidium halophilum* n. spec. ein sehr regelmäßiges Muster bilden. Die Papillen durchbrechen von innen die Membran und wölben sich nur wenig vor (Abb. 4c). Das reife Sporangium hat einen Durchmesser von 90–100 μ . Die runden Zoosporen schwärmen, nachdem die ersten durch die verquellenden Papillen hinausgepreßt wurden, einzeln aus. Sie haben 6 μ Durchmesser und einen Globul, dessen Lage nicht fest fixiert ist, der sich aber meist seitlich befindet. Die hinten inserierte Geißel ist 60 μ lang und peitschenförmig (Abb. 4d). Die ganze Entwicklung vom Schwärmen eines Sporangiums bis zum fertig ausgebildeten schwarmreifen Sporangium der zweiten Generation dauerte drei Tage. Dauersporangien haben dieselbe Größe wie die normalen Sporangien, sind mit einer derben, stark lichtbrechenden, glatten Wand umgeben und enthalten in ihrem granulierten Plasma einen großen Öltropfen, der fast die ganze Zelle ausfüllt und exzentrisch gelagert ist (Abb. 4e). Die Apophyse der Dauersporangien ist klein, das Rhizoid auffallend kräftig und gespreizt ausgebildet.

Auch dieser Pilz konnte auf Pollen artrein kultiviert werden. Er unterscheidet sich von den bekannten Phlyctochytrien durch die Vielzahl und regelmäßige Anordnung seiner Papillen sowie durch deren Form. Er gleicht am meisten *Phlyctochytrium synchytrii*, seine Papillen sind aber niemals fingerförmig gebogen und weniger lang. Von dem von GAERTNER (1954,₁) beschriebenen *Phlyctochytrium kniepii* unterscheidet er sich durch die Größe seiner Zoosporen und das völlig anders ausgebildete Dauersporangium. Wegen der zierlichen Form seiner vegetativen Sporangien soll er *Phlyctochytrium spectabile* genannt werden.

Phlyctochytrium spectabile n. spec.

Zoosporangium kugelig, 60–100 μ im Durchmesser mit 15–25 kleinen, uhrglasförmigen, 4 μ breiten Papillen. Rhizoidales System mit einer subsporangialen Blase und ausgebreiteten, verzweigten, zarten Rhizoiden. Zoosporen 6 μ im Durchmesser, rund, mit einem meist seitlich gelegenen Globul und 60 μ langer Schubgeißel. Dauersporangien 60–100 μ im Durchmesser mit kleiner Apophyse, kräftig entwickeltem Rhizoid und

dicke, glatte Sporangienwand. Im Innern der Dauersporangien ein großer, fast das ganze Sporangium ausfüllender, exzentrisch gelagerter Öltropfen.

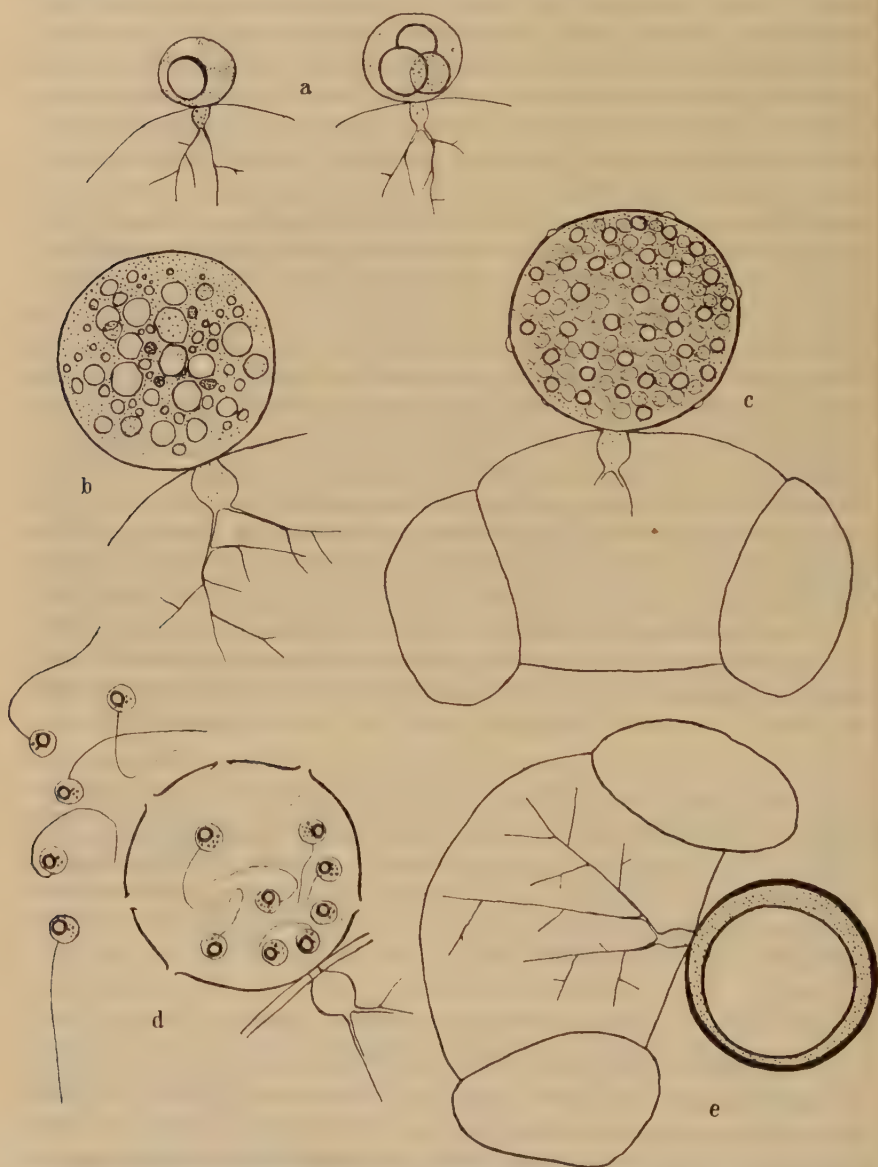


Abb. 4. *Phlyctochytrium spectabile* n. sp. a—b Entwicklungsstadien. c Schwarmreifes Sporangium. d Ausschwärmendes Sporangium mit Schwärmen außerhalb. e Optischer Querschnitt eines Dauersporangiums. Auf *Pinuspollen*. Vergr. 500 x

5. *Phlyctochytrium semiglobiferum* n. spec.

Ein zweites noch unbekanntes *Phlyctochytrium*, das in Stranderdproben der Nord- und Ostsee sowie des Mittelmeeres an verschiedenen Standorten gefunden und von HARDER u. UEBELMESSER (1955) als *Phlyctochytrium* spec. bezeichnet worden ist, hat ebenfalls eine gewisse Ähnlichkeit mit *Phlyctochytrium synchytrii*, weicht aber durch seine großen, halbkugeligen Papillen von allen bisher bekannten Arten ab. Die Zoosporangien sind rund, haben 40—80 μ Durchmesser und 2—5 große Papillen (Durchmesser 10 μ) (Abb. 5c). Die Sporangienwand ist zart und glatt. Der Inhalt des Sporangiums ist fein granuliert mit einigen unregelmäßig verteilten gröberen Granula. Die Apophyse ist im Pollenkorn dick rübenartig angeschwollen (Abb. 5f). Die Zoosporen werden durch die großen Öffnungen, die beim Verquellen der Papillen entstehen, einzeln entlassen. Sie sind schon im reifen Sporangium weitgehend ausdifferenziert (Abb. 5d). Beim Schwärmen sind sie vorübergehend amöboid, nehmen aber bald Kugelgestalt an (Durchmesser 6 μ) und haben zwei Globuli, die dem Geißelansatzpunkt gegenüberliegen. Ihre Geißeln sind 25 μ lang und spitz zulaufend. Nach Austreiben des Keimschlauches schwillt die Zoospore an (Abb. 5a) und Öltropfen treten auf. Die Apophyse schwillt erst an, nachdem schon die ersten Verzweigungen am Rhizoid entstanden sind (Abb. 5b). Die Papillen werden schon frühzeitig am jungen, noch nicht zur endgültigen Größe herangewachsenen Sporangium ausgebildet, solange das Plasma noch gleichmäßig granuliert ist. Die Zoosporen werden aber erst im ausgewachsenen Sporangium ausdifferenziert. Bei Kulturen, die etwa einen Monat alt sind, findet man Dauersporangien (Abb. 5g), die, kleiner als die vegetativen Sporangien, eine stark verdickte Membran haben, durch die aber die Papillen durchgebrochen sind. Der Inhalt der Dauersporangien ist ebenfalls fein granuliert mit einigen gröberen Körnern im Zentrum. Bei der Keimung entstehen direkt im Dauersporangium Zoosporen, die durch die Papillen entlassen werden.

Es gelang, den Pilz durch Ausstreichen von in sterilen Wassertropfen geschwärmten Zoosporen (GAERTNER, 1954₂) auf Agar zu übertragen und hier weiterzukultivieren. Außer der Ausbildung der Apophyse, die auf Pollen dick rübenförmig, auf Agar langgestreckt rübenförmig war, zeigten sich keine morphologischen Formverschiedenheiten. Da der Pilz in Seewasseransätzen sehr häufig war, wurden die ersten Ausstriche auf Seewasseragar ohne weitere Zusätze von organischen Nahrungsquellen gemacht. Dies hatte den Vorteil, daß sich die Bakterien schlecht entwickelten, wodurch man sehr bald zu bakterienreinen Kulturen kam. Später gedieh der Pilz auch auf Pepton-Malz-Agar (0,3% Pepton, 0,3% Malzextrakt, 1% Agar). Seine Entwicklung war auf diesem Substrat viel üppiger. Auf Seewasseragar hatten sich viele Schwärmer nach der Ausbildung des

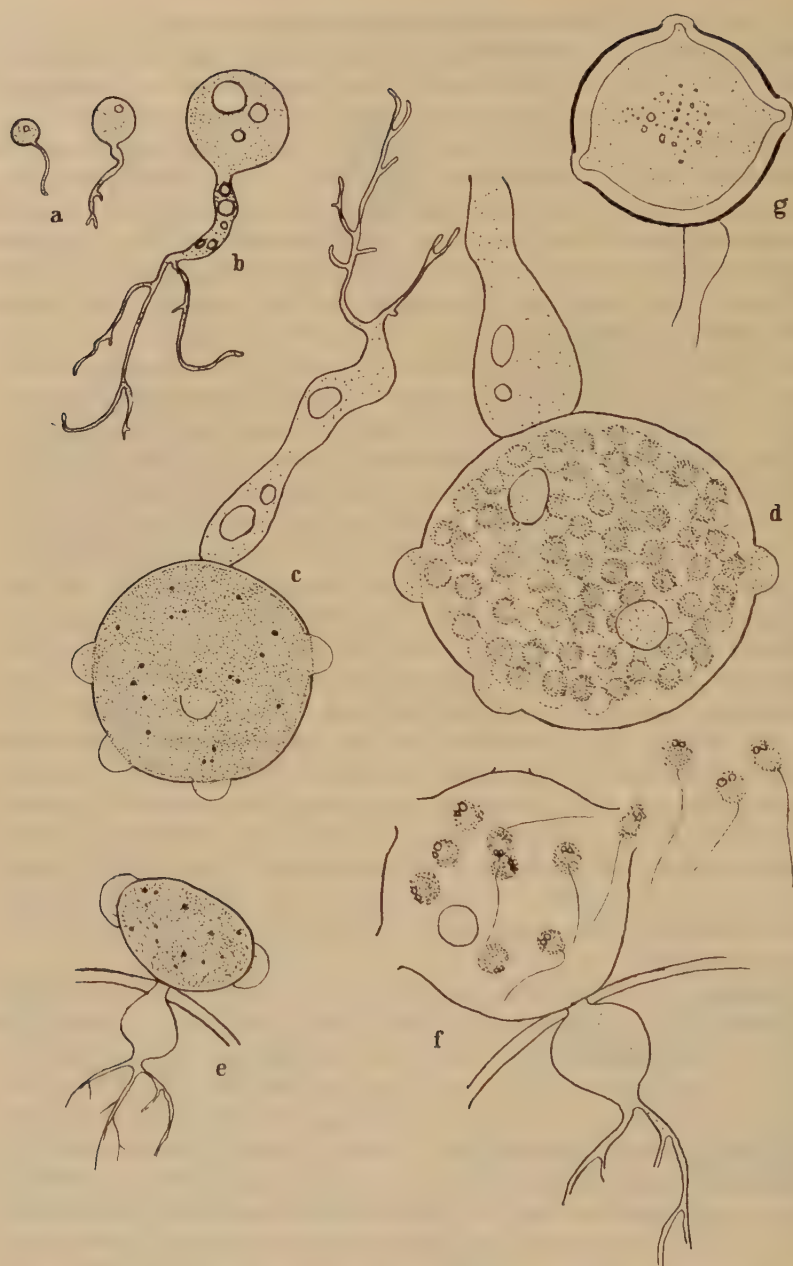


Abb. 5. *Phlyctocytrium semiglobiferum* n. sp. a—c Entwicklungsstadien des Pilzes auf Agar. d Schwarmreifes Sporangium auf Agar. e Junges Sporangium auf *Pinuspollen*. f Schwärmer entlassendes Sporangium auf Pollen. g Dauersporangium auf Agar. Vergr. 500 ×

Keimschlauches nicht weiterentwickelt, und die Kulturen wuchsen deshalb langsam. Auf Pepton-Malz-Agar wurden keine solche abgestorbenen Keimlinge gefunden; außerdem wurde das Größenwachstum der Sporangien gefördert, die morphologische Gestalt blieb aber unverändert. Versuche auf Carragen-Agar zur Feststellung der metabolischen Befähigung der Schwärmer, wie sie GAERTNER (1954,₃) bei einigen Phlyctochytrien nachgewiesen hat, zeigten auch bei unserer Art das Phänomen, daß die Zoosporen auf diesem Substrat ihre Kugelgestalt aufgaben, sich in die Länge streckten und mit vorne sitzender, umgeklappter Geißel schwammen.

Der Pilz erhielt seine Artmerkmale zweieinhalb Jahre auf Pollen und Agar konstant. Wegen seiner großen, halbkugeligen Papillen soll er *Phlyctochytrium semiglobiferum* n. spec. genannt werden.

Phlyctochytrium semiglobiferum n. spec.

Sporangien kugelig, Durchmesser 40—80 μ (auf Agar bis 500 μ), mit glatter Wand und 2—5 halbkugelförmigen, großen, 10 μ breiten Papillen. Zoosporen einzeln schwärmend, 6 μ im Durchmesser mit zwei Globuli am vorderen Pol, opisthokont, mit 25 μ langer Geißel. Apophyse rundlich rübenförmig in Pollen, langgestreckt rübenförmig auf Agar. Rhizoid kräftig entwickelt, verzweigt. Dauersporangien 20—30 μ im Durchmesser, mit dicker Wand und kleineren Papillen. Zoosporengröße auf Agar wie auf Pollen gleich.

6. Rhizophlyctis harderi n. spec.

In Seewasser- und in Süßwasseransätzen der Sandproben vom Lido von Venedig fielen an einzelnen Standorten den Pollenkörnern aufsitzende Sporangien auf, die eine Anzahl kräftiger Rhizoide zu einem benachbarten Pollenkorn schickten, und sich dort damit festhefteten (Abb. 7). Diese Sporangien wurden isoliert und in Wasserkultur mit Pollen genommen. In den Folgekulturen zeigten sich neben diesen Sporangien zahlreiche andere mit weniger dicker Membran, denen der auffällige Rhizoidstrang fehlte, an denen aber bisweilen, nicht an allen, zarte, verzweigte Rhizoide zu sehen waren, die an verschiedenen Stellen auf dem Sporangium entsprangen (Abb. 6). Durch Beobachten von Einsporangienkulturen in Hängetropfen und feuchten Kammern zeigte sich der Entwicklungsgang des Pilzes.

Bringt man ein schwarmreifes Sporangium des zweiten, also rhizoidstrangfreien Typus (Abb. 6b), in den Hängetropfen (Quellwasser + 5% Erddekot, mit einigen sterilen Pollenkörnern), so entläßt es schon nach einigen Stunden Schwärmer. Die Sporangienwand öffnet sich an der Spitze des Sporangiums allmählich, die Sporen quellen als eine große Blase heraus (vgl. Abb. 7g), die Wände des Sporangiums weichen seitlich zurück und biegen sich an ihren Enden etwas nach hinten um. Ist das Volumen der herausgequollenen Sporangienmasse etwa so groß wie

das Sporangium selbst, fangen die Zoosporen an, sich voneinander zu trennen, die Geißeln werden ausgezogen, und die Zoosporen schwimmen weg (Abb. 6c). Sie haben 4μ Durchmesser und sind rund, mit einem

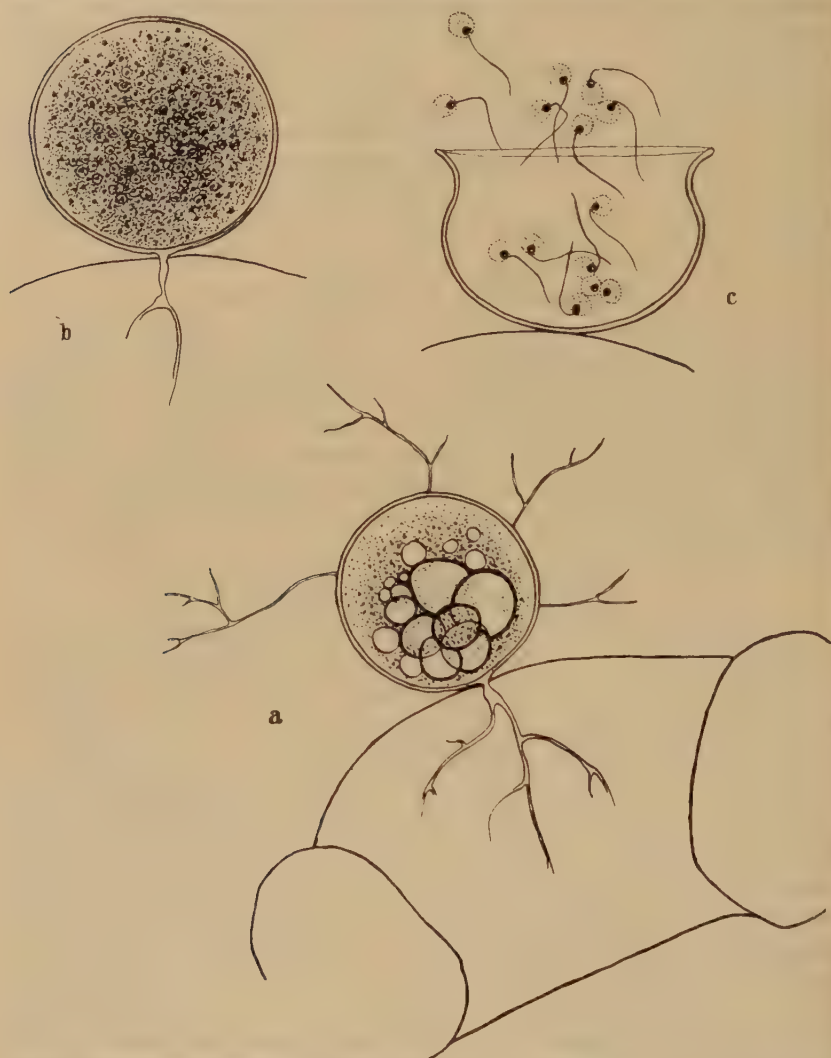


Abb. 6. *Rhizophlyctis harderi* n. sp. a Junges Sporangium auf Pinuspollen. b Fast schwarmreifes Sporangium. c Schwärmer entlassendes Sporangium. Vergr. 800 \times

kleinen, aber ausgeprägten Globul am Geißelansatzpunkt. Geißellänge $15-20\mu$, Insertion hinten. Die Zoosporen schwimmen einige Stunden schnellend-hüpfend durch den Tropfen und setzen sich dann an den eingestreuten Pollenkörnern fest. Dort keimen sie im Lauf eines Tages zu

einer kleinen, grob granulierten Blase, mit zartem Rhizoid, das an einer Stelle ganz schwach verdickt ist; hier verzweigt es sich. Das Bläschen wächst am zweiten Tag zu einem Sporangium desselben Typus heran. Der Entwicklungsgang kann sich so einige Zeit wiederholen. Es können aber auch schon in der zweiten Generation und ohne erkennbaren äußeren Anlaß neben diesen Sporangien die Sporangien des ersten Typus (Abb. 7 d) auftreten.

Die Sporangien dieses Typs haben außer ihren langen, strangartigen Rhizoiden eine derbe, glatte Membran, die stark lichtbrechend ist, und in ihrem Innern einen einzigen, ebenfalls stark lichtbrechenden, exzentrischen Reservestoffkörper (Abb. 7 d). Im Verlauf mehrerer Tage teilt sich dieser Körper im alten Medium wie auch nach Übertragung in einen neuen Hängetropfen in kleinere Portionen auf, die fein granuliert erscheinen, und fast die ganze Zelle ausfüllen (Abb. 7 e). Wenn dieser Prozeß beendet ist, beginnen sich die Rhizoide in zwei Gruppen auseinanderzuschieben, während in der Mitte zwischen ihnen eine dünnwandige, bauchige Vorwölbung entsteht. Die Auswölbung vergrößert sich ständig, und eine dicke Blase von Zoosporen, die noch bewegungslos zusammenliegen, wird herausgedrückt (Abb. 7 f und g). Der weitere Schwärmvorgang ist derselbe wie bei den Sporangien des anderen Typus. Ist etwa die Hälfte der sporenbildenden Masse aus dem Sporangium gelangt, differenzieren sich die Zoosporen zuerst außerhalb des Sporangiums, dann auch in demselben aus. Die leere Sporangienhülle hat dieselbe Form, wie beim anderen Typ, ist aber derber (Abb. 7 g). Die Rhizoide, die dem Sporangium noch einige Zeit anhängen, fallen allmählich ab und verschwinden. Die Zoosporen, die aus diesen Sporangien entlassen werden, sind größer als die des anderen Typus. Sie haben einen Durchmesser von $5,5\ \mu$, ihre Geißel ist $25\ \mu$ lang. Der Globul der Zoospore liegt ebenfalls hinten in der Nähe des Geißelinsertionspunktes; er ist größer und weniger stark lichtbrechend (Abb. 7 h). Aus diesen Zoosporen konnten sich Sporangien beider Typen entwickeln. Handelte es sich um den Typ mit den langen Rhizoiden, so bildeten sie zunächst eine Blase mit einigen stark lichtbrechenden Inhaltskörpern und mit verdicktem, apophysenartig aufgeschwollenem Rhizoid im Pollenkorn (Abb. 7 a). Die Rhizoide am apikalen Pol wurden erst entwickelt, wenn das Sporangium fast ausgewachsen war. Sie endeten entweder in einem benachbarten Pollenkorn (Abb. 7 b) oder aber auch frei in der Flüssigkeit (Abb. 7 c). Da die Bedingungen im Hängetropfen nicht besonders günstig waren, konnten nicht mehr als zwei aufeinanderfolgende Generationen im selben Tropfen beobachtet werden. Ein Teil der Sporangien wurde deshalb wieder einzeln in Esmarschschälchen mit Erddekotwasser und Pollen gebracht. Dort traten dann später in allen Schälchen, gleich mit welchem Sporangientyp sie beimpft waren, die Sporangien beider Typen auf. Da keine kopulierenden Schwärmer beobachtet werden konnten, ist das dickwandige Sporangium mit Rhizoid-

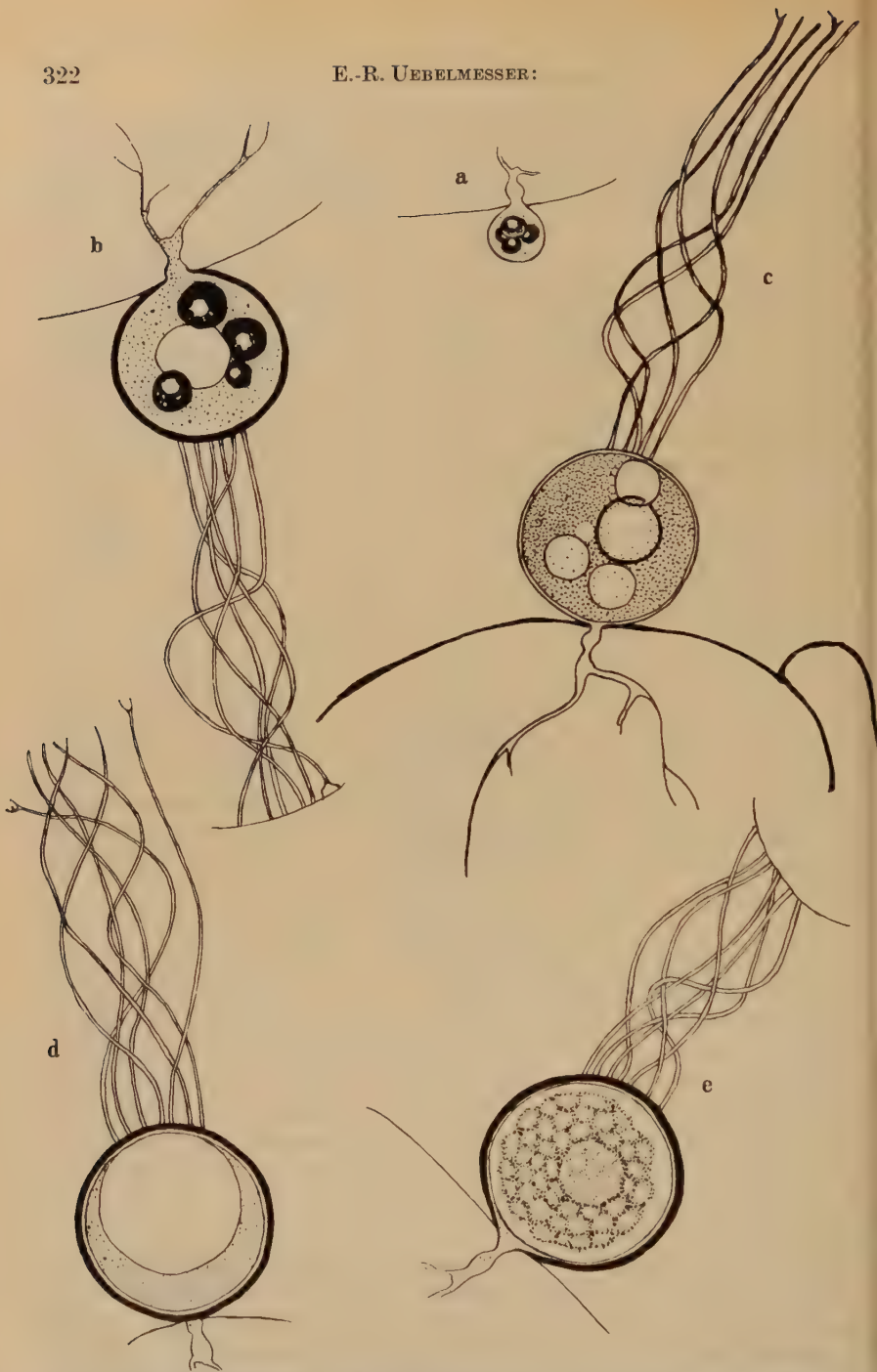
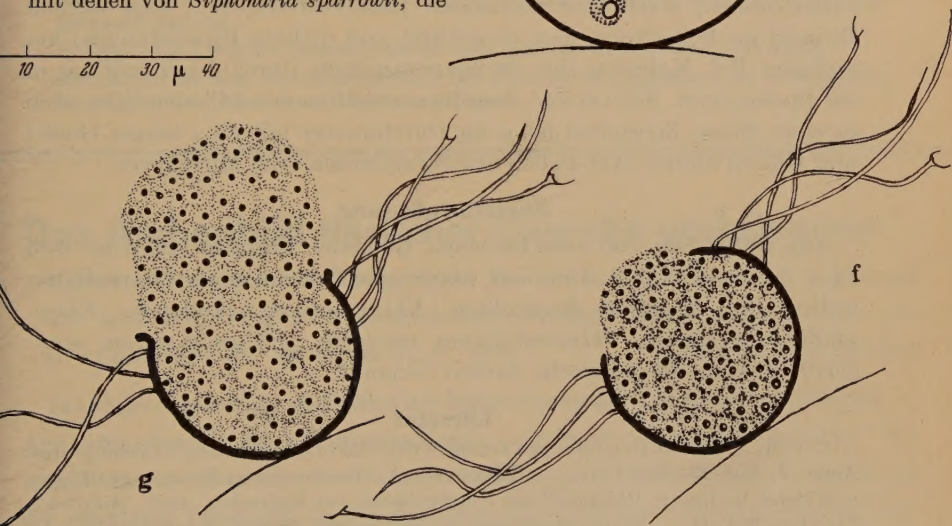


Abb. 7. *Rhizophlyctis harderi* n. sp. a gekeimte Zoospore. b u. c junges Dauersporangium. d Dauersporangium im Ruhezustand. e Dauersporangium mit ausdifferenzierten Zoosporen. f—h Entlassung der Schwärmer aus dem Dauersporangium. Vergr. 800 \times

strang als Dauersporangium angesehen worden, obwohl dagegen sprechen könnte, daß die Zoosporen aus solchen Dauersporangien manchmal gleich wieder zu Dauersporangien heranwachsen.

Der Pilz behielt seine Eigenschaften während drei Jahren.

Er ist die einzige Chytridinee, die nur an den Küsten des Mittelmeeres vorkam. Dort wurde er außer am Lido von Venedig auch an der Küste von Elba, an der Costa Brava von Spanien und bei Montpellier gefunden. Er wurde zunächst wegen seines Rhizoidbündels, das beim Schwärmen auseinanderweicht und die Zoosporen zwischen sich entläßt, wegen seiner polyphagen Eigenschaft und wegen der Ähnlichkeit seiner derbwandigen Sporangien mit denen von *Siphonaria sparrowii*, die



KARLING (1945) beschreibt, als *Siphonaria spec.* bezeichnet (HARDER u. UEBELMESSER 1955). Seine Zuordnung zur Gattung *Siphonaria* stößt bei genauerer Kenntnis auf Schwierigkeiten. Erstens sind niemals anastomosenartig konjugierende Rhizoide und Sexualität beobachtet worden, die sowohl PETERSEN (1903) als auch KARLING (1945) beschreiben. Zweitens entspringen die Rhizoide dort von einer Stelle, zumindest an einer einzigen verbreiterten Achse, während hier eine polare Anordnung zweier Rhizoidsysteme beim Dauersporangium und die auf der ganzen Oberfläche verteilten, zarten, verzweigten Rhizoide beim Sporangium vorhanden sind. Die Sporangien erlauben eine Einordnung in die Gattung *Rhizophlyctis*, obwohl dort keine Apophyse beschrieben worden ist. Sonst stimmen die Merkmale mit denen dieser Gattung überein: Der Thallus ist monozentrisch, eukarpisch, gewöhnlich polyphag, besteht aus reproduktivem Körper und unverzweigtem oder verzweigtem, aus mehreren Achsen bestehenden Rhizoid, dessen Spitzen gewöhnlich nur endobiotisch sind. Das Sporangium ist unbedeckelt, die Zoosporen sind opisthokont,

gewöhnlich mit einem einzigen Globul, schwärmen in einer Blase, aus der sie schlüpfen. Die Dauerspore ist dickwandig.

Da der Organismus diese Merkmale trägt, sei er der Gattung *Rhizophlyctis* zugeordnet, wenn auch für die Dauersporangien die polare Anordnung der Rhizoide und für beide Sporangientypen die Ausbildung einer kleinen Apophyse hinzukommt. Er sei *Rhizophlyctis harderi* n. spec. genannt.

Rhizophlyctis harderi n. spec.

Sporangien kugelig, glattwandig, 40—60 μ im Durchmesser. Rhizoide an einer bis mehreren Stellen auf dem Sporangium entspringend, zart, verzweigt, nur eines im Pollenkorn mit kleiner Apophyse. Zoosporen opisthokont mit einem Globul; sie werden durch eine apikale bis 40 μ breite Öffnung in einer Blase entlassen, sind rund, 4 μ im Durchmesser mit 20 μ langer Geißel. Dauersporangium glatt- und dickwandig mit einem großen, exzentrischen, stark lichtbrechenden Reservestoffkörper, sehr zartem Rhizoid im Pollenkorn, dem es aufsitzt und dickem Rhizoidbündel am apikalen Pol. Keimung des Dauersporangiums durch Umwandlung in ein Sporangium. Schwärmen desselben zwischen den apikalen Rhizoiden in einer Blase. Zoosporen 5,5 μ im Durchmesser mit 25 μ langer Geißel und Globul hinten. Auf Pollen aus Stranderden vom Mittelmeer.

Zusammenfassung

Aus Erdproben von verschiedenen Gebieten Europas und zum Teil auch Australiens und Amerikas wurde eine Anzahl neuer Chytridineen isoliert und *Olpidium longicollum*, *Rhizophidium halophilum*, *Rhizophidium utricularae*, *Phlyctochytrium spectabile*, *Phlyctochytrium semiglobiferum* und *Rhizophlyctis harderi* benannt.

Literatur

- COUCH, N. J.: The structure and action of the cilia in some aquatic Phycomycetes. Amer. J. Bot. **28**, 704 (1941). — GAERTNER, A.: Beschreibung dreier neuer Phlyctochytrien und eines Rhizophidium (Chytridiales) aus Erdboden. Arch. Mikrobiol. **21**, 112 (1954, 1). — Einige physiologische und morphologische Beobachtungen an Kulturen niederer Phycomyceten (Rhizophidium, Phlyctochytrium). Arch. Mikrobiol. **21**, 167 (1954, 2). — Beobachtungen über die Bewegungsweise von Chytridienzoosporen. Arch. Mikrobiol. **20**, 423 (1954, 3). — HARDER, R., und E. UEBELMESSER: Über marine saprophytische Chytridiales und einige andere Pilze vom Meeresboden und Meeresstrand. Arch. Mikrobiol. **22**, 87 (1955). — KARLING, J. S.: A large species of Rhizophidium from cooked beef. Bull. Torrey Bot. Club, **65**, 439 (1938). — Brazilian Chytrids VII. Observations relative to sexuality in two new species of Siphonaria. Amer. J. Bot. **32**, 580 (1945). — An *Olpidium* parasitic of *Allomyces*. Amer. J. Bot. **35**, 504 (1948). — PETERSEN, H. E.: Note sur quelques Phycomycetes. J. de Botanique **17**, 220 (1903). — SCHERFFEL, A.: Einiges über neue oder ungenügend bekannte Chytridineen. Arch. f. Protistenkde. **54**, 167 (1926). — SPARROW, F. K.: Aquatic Phycomycetes exclusive the Saprolegniaceae and Pythium. Ann Arbor. The University of Michigan Press (1943). — VALCANOV, A.: Protistenstudien 7. Beitrag zur Kenntnis der Süßwasserphycomyceten Bulgariens. Arch. f. Protistenkde. **76**, 361 (1931).

Aufnahmebedingungen

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Bei Arbeiten aus Instituten, Kliniken usw. ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photos. Vorlagen für Diagramme sind in etwa doppelter Reproduktionsgröße erwünscht.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Selbständige kritische Sammelreferate über einzelne Gebiete sind erwünscht.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse im Umfang von im allgemeinen höchstens 1 Seite anzufügen.

Das Aschenbild tierischer Gewebe und Organe

Methodik, Ergebnisse und Bibliographie. Von Dr. med. E. HINTZSCHE, o. Professor der Anatomie, Direktor des Anatomischen Institutes der Universität Bern. Mit 80 Abbildungen. IV, 140 Seiten Gr.-8°. 1956. Steif geheftet DM 39,60

Inhaltsverzeichnis: Definition der Mikroveraschung. — Historischer Rückblick. — Anwendungsbereich der Schnittveraschung. — Technik der Schnittveraschung: Vorbehandlung des Materiales. Der Veraschungsvorgang. — Mikroskopische Untersuchung der veraschten Präparate: Das Spodogramm. Die optischen Untersuchungsmethoden. Physikalische Methoden der Aschenanalyse. Chemische Methoden der Aschenanalyse. — Ergebnisse der Veraschungsforschung. Das Aschenbild von Protozoen und Avertebraten, der tierischen Zelle, des Epithelgewebes und der Drüsenzellen, der Binde- und Stützgewebe, des Muskelgewebes, des Nervengewebes und der nervösen Zentralorgane, des Blutes und der Zirkulationsorgane, der Atmungsorgane, der Verdauungsorgane, der Harnorgane, der männlichen Geschlechtsorgane, der weiblichen Geschlechtsorgane, der Haut und ihrer Anhangsorgane, der inkretorischen Organe, der Sinnesorgane; embryologische Aschenbilder. — Bedeutung der Spodographie. — Literatur. — Namen- und Sachverzeichnis.

Protozoologie

Von **Karl G. Grell**, apl. Professor für Zoologie und wissenschaftliches Mitglied am Max-Planck-Institut für Biologie in Tübingen. Mit 300 Abbildungen. VII, 284 Seiten Gr.-8°. 1956. Ganzleinen DM 59,—

Inhaltsübersicht: **Einleitung.** — **Abgrenzung und Begriff.** — **Morphologie.** Das Cytoplasma. Die Zellmembran. Der Zellkern. — **Fortpflanzung.** Äquale Zellteilung. Inäquale Zellteilung. Reorganisation. — **Befruchtung und Geschlechtlichkeit.** Gametogamie. Gamontogamie. Parthenogenese. — **Generationswechsel.** — **Modifikabilität.** — **Vererbung.** Kreuzungsversuche. Mutationen. Langdauernde Veränderungen in Klonen. — **Bewegung.** Ortsveränderung. Gestaltveränderung. — **Verhalten.** — **Ernährung.** — **Parasitismus und Symbiose.** — **Formenübersicht.** I. Klasse: Flagellata. 1. Ordnung: Chrysomonadina. 2. Ordnung: Cryptomonadina. 3. Ordnung: Phytomonadina. 4. Ordnung: Euglenoidina. 5. Ordnung: Dinoflagellata. 6. Ordnung: Protomonadina. 7. Ordnung: Diplomonadina. 8. Ordnung: Polymastigina. 9. Ordnung: Opalinida. II. Klasse: Rhizopoda. 1. Ordnung: Amoebina. 2. Ordnung: Testacea. 3. Ordnung: Heliozoa. 4. Ordnung: Radiolaria. 5. Ordnung: Foraminifera. III. Klasse: Sporozoa. 1. Ordnung: Gregarinida. 2. Ordnung: Coccidia. IV. Klasse: Ciliata. 1. Unterklasse: Euciliata. 1. Ordnung: Holotricha. 2. Ordnung: Spirotricha. 3. Ordnung: Peritricha. 4. Ordnung: Chonotricha. 2. Unterklasse: Suctoria. — **Veröffentlichungen.** Zusammenfassende Darstellungen. Einzelarbeiten und Werke aus Nachbargebieten. Filme. — **Sachverzeichnis.** — **Artenverzeichnis.**

Die Protozoologie ist keine besondere Wissenschaft, sondern nur die Zusammenfassung der Kenntnisse, welche wir von einer bestimmten Tiergruppe, den Protozoen, besitzen. Sie ist daher nichts weiter als ein Teil der speziellen Zoologie. Trotzdem hat das Wort „Protozoologie“ einen besonderen Klang. Mehr als alle anderen Tiergruppen haben die Protozoen dazu angeregt, Fragen von allgemeiner biologischer Bedeutung aufzuwerfen, und nicht wenige Fragen sind mit ihrer Hilfe beantwortet worden oder einer Beantwortung näher gerückt.

In anderen Ländern ist die Bewertung der Protozoen als Untersuchungsobjekte in ständigem Anstieg begriffen. Äußerlich kommt dies z. B. darin zum Ausdruck, daß die im Jahre 1947 in den USA gegründete „Society of Protozoologists“ heute bereits über 450 Mitglieder zählt. Seltsamerweise ist aber das Interesse an den Protozoen unter den deutschen Biologen immer mehr im Schwinden begriffen. Mit diesem Buch möchte der Verfasser dazu beitragen, dieses Interesse neu zu beleben. In einer Zeit, in welcher die Biologie das Lebensproblem von den verschiedensten Seiten in Angriff nimmt, scheint ihm die Bedeutung der Protozoen vor allem darin zu bestehen, daß sie dem Forscher die Möglichkeit geben, eine einzelne Zelle in ihrer Differenzierung, Fortpflanzung und Vererbung unmittelbar zu studieren. Indem er die Mannigfaltigkeit der Erscheinungsformen vor dem Leser ausbreitet, ist der Verfasser bestrebt, ihn überall bis zu den aktuellen Fragen der Lebensforschung, soweit die Protozoen zu ihrer Lösung beigetragen haben, hinzuführen.

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG